Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition

Guida di Riferimento ai Principi Operativi

Agilent Technologies

Informazioni legali

© Agilent Technologies, Inc. 2010-2012

Nessuna parte di questo manuale può essere riprodotta in alcun formato o con alcun mezzo (inclusa l'archiviazione e la scansione elettroniche o la traduzione in una lingua straniera) senza previo consenso scritto di Agilent Technologies, Inc. secondo le disposizioni di legge sul diritto d'autore degli Stati Uniti, internazionali e locali applicabili.

Codice del manuale

M8301-94023

Edizione

5/2012

Stampato in Germania

Agilent Technologies
Hewlett-Packard-Strasse 8
76337 Waldbronn

Questo prodotto può essere utilizzato come componente di un dispositivo diagnostico in vitro qualora sia stato registrato presso le autorità competenti e sia conforme alle disposizioni di legge vigenti. In caso contrario è destinato esclusivamente ad usi generici di laboratorio.

Revisione software

Questa guida si riferisce alla versione C.01.04 di Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition.

Microsoft® è un marchio registrato di Microsoft Corporation negli Stati Uniti.

Garanzia

Le informazioni contenute in questo documento sono for-nite allo stato corrente e sono soggette a modifiche senza preavviso nelle edizioni future. Agilent non rilascia alcuna altra garanzia, esplicita o implicita, comprese le garanzie implicite di commerciabilità ed idoneità ad uno uso speci-fico, relativamente al presente manuale e alle informazioni in esso contenute. Salvo il caso di dolo o colpa grave, Agilent non sarà responsabile di errori o danni diretti o indi-retti relativi alla fornitura o all'uso di questo documento o delle informazioni in esso contenute. In caso di separato accordo scritto tra Agilent e l'utente con diverse condizioni di garanzia relativamente al contenuto di questo documento in conflitto con le condizioni qui riportate prevarranno le condizioni dell'accordo separato.

Licenze tecnologia

I componenti hardware e o software descritti in questo documento vengono forniti con licenza e possono essere utilizzati o copiati solo in conformità ai termini di tale licenza.

Indicazioni di sicurezza

AVVERTENZA

L'indicazione **AVVERTENZA** segnala un rischio. Richiama l'attenzione su una procedura operativa o analoga operazione che, se non eseguita correttamente o non rispettata, può provocare danni al prodotto o la perdita di dati importanti. Non eseguite mai alcuna operazione ignorando l'**AVVERTENZA**, fatelo solo dopo aver compreso e applicato completamente le indicazioni di Agilent.

ATTENZIONE

L'indicazione ATTENZIONE segnala un rischio serio. Richiama l'attenzione su una procedura operativa o analoga operazione che, se non eseguita correttamente o non rispettata, può provocare lesioni personali o morte. Non eseguite mai alcuna operazione ignorando l'indicazione ATTENZIONE, fatelo solo dopo aver compreso e applicato completamente le indicazioni di Agilent.

In questa guida...

Questa guida è destinata a utenti avanzati, amministratori e addetti al sistema responsabili della convalida di Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition. Contiene informazioni di riferimento sui principi operativi, i calcoli e gli algoritmi di analisi dei dati usati in Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition.

Utilizzare questa guida per verificare le funzionalità del sistema rispetto alle specifiche richieste dall'utente e per definire ed eseguire le attività di convalida del sistema definite nel piano di convalida. Le seguenti risorse contengono ulteriori informazioni.

- Per i concetti di OpenLAB CDS ChemStation Edition, nuove funzionalità e flussi di lavoro: Il manuale *OpenLAB CDS ChemStation Edition – Concetti di base e flussi di lavoro*.
- Per informazioni specifiche per il contesto (“Come fare”) sulle attività, un corso autodidattico, riferimenti all'interfaccia utente e guida alla risoluzione dei problemi: La guida in linea di ChemStation.
- Per dettagli sull'installazione del sistema e sulla preparazione del sito: La guida all'*Installazione della workstation Agilent OpenLAB CDS*.
- Per dettagli sui principi e le attività di amministrazione del sistema: *Guida all'amministrazione del sistema Agilent OpenLAB CDS*.

1 Acquisizione dei dati

Questo capitolo descrive i concetti di acquisizione dati, file di dati, registro elettronico e altro ancora.

2 Integrazione

Questo capitolo spiega come effettuare le operazioni di integrazione e illustra gli algoritmi di integrazione della ChemStation. Vengono descritti l'algoritmo di integrazione, l'integrazione e l'integrazione manuale.

3 Identificazione dei picchi

Questo capitolo spiega come identificare i picchi.

4 Calibrazione

Questo capitolo descrive i principi di calibrazione del software ChemStation.

5 Quantificazione

Questo capitolo descrive le modalità con cui la ChemStation effettua operazioni di quantificazione. In particolare, fornisce informazioni sui calcoli di area % e altezza %, standard esterno (ESTD), normalizzazione %, standard interno (ISTD) e sulla quantificazione di picchi non identificati.

6 Valutazione dell'idoneità del sistema

Questo capitolo descrive ciò che può fare la ChemStation per valutare le prestazioni sia dello strumento analitico prima che venga utilizzato per l'analisi del campione e del metodo analitico prima che sia utilizzato normalmente sia per controllare le prestazioni dei sistemi di analisi prima e durante le analisi di routine.

7 Calcoli specifici per CE

Questo capitolo è pertinente solo se si utilizza ChemStation per controllare gli strumenti CE.

8 Revisione dei dati, rielaborazione e revisione dei lotti

Questo capitolo illustra le varie procedure disponibili per revisionare i dati e spiega come rielaborare i dati della sequenza. Inoltre, descrive i concetti di revisione e configurazione dei lotti, le funzioni di revisione e la stesura dei report sui lotti.

9 Reporting

In questo argomento viene spiegato e fornito un riferimento allo schema ACAML utilizzato nella funzionalità Intelligent Reporting del software OpenLAB CDS.

10 Verifica del sistema

Questo capitolo descrive la funzione di verifica e le funzioni di verifica GLP della ChemStation.

Sommario

1 Acquisizione dei dati 9

Che cosa si intende per acquisizione dei dati? 10
Informazioni sullo stato 13

2 Integrazione 15

Che cos'è l'integrazione? 17
Gli algoritmi di integrazione della ChemStation 19
Principio di funzionamento 25
Riconoscimento dei picchi 26
Collocazione della linea di base 34
Misurazione dell'area del picco 47
Eventi di integrazione 50
Integrazione manuale 59

3 Identificazione dei picchi 63

Che cos'è l'identificazione dei picchi? 64
Regole di corrispondenza dei picchi 65
Tipi di identificazione dei picchi 66
Tempo di ritenzione/migrazione assoluto 68
Tempi di ritenzione/migrazione corretti 70
Qualificatori dei picchi 72
Il procedimento di identificazione 75

4 Calibrazione 77

Curva di calibrazione 78
Calibrazione di gruppo 80
Opzioni di ricalibrazione 81

5 Quantificazione 83

Che cos'è la quantificazione? 84
Calcoli di quantificazione 85
Fattori di correzione 86
Procedimenti di calcolo non calibrati 88
Procedimenti di calcolo calibrati 89
Calcolo dello standard esterno 90
Calcolo con il procedimento della normalizzazione % 93
Calcolo con il procedimento dello standard interno 94

6 Valutazione dell'idoneità del sistema 99

Valutazione della system suitability 101
Determinazione del rumore di fondo 104
Calcolo della simmetria del picco 113
Formule e calcoli di idoneità del sistema 115
Definizioni generali 116
Definizioni di test sulle prestazioni 117
Definizioni per la riproducibilità 126
Accesso ai numeri a doppia precisione memorizzati internamente 131

7 Calcoli specifici per CE 135

Tavole di calibrazione 136
Calibrazione mediante correzione della mobilità 139
Stili di rapporto speciali per elettroforesi capillare 145
Aree del picco corrette 146
Applicabilità del sistema per elettroforesi capillare 147
CE-MSD 148

8 Revisione dei dati, rielaborazione e revisione dei lotti 149

Tavola di navigazione in Analisi dei dati 150
Che cos'è la revisione di un lotto? 156
Abilitazione della funzionalità di revisione dei lotti con l'opzione OpenLAB CDS con ECM 157
Configurazione del lotto 158
Funzioni di revisione 161
Rapporto relativo al lotto 162

9 Reporting 163

Che cos'è ACAML? 164
Schema ACAML 165
Reporting dei fattori della Farmacopea in ChemStation 166

10 Verifica del sistema 169

Finestre Verification (Verifica) e Diagnosis (Diagnosi) 170
Il registro GLPsave 173
Funzione DAD Test (verifica del rivelatore a serie di diodi) 175

1
Acquisizione dei dati

Che cosa si intende per acquisizione dei dati? 10
- File di dati 10
- Monitor in linea 12
- Registro elettronico 12

Informazioni sullo stato 13
- Stato della ChemStation 13
- Barra di stato 13
- Diagramma di sistema 14

Questo capitolo descrive i concetti di acquisizione dati, file di dati, registro elettronico e altro ancora.

Che cosa si intende per acquisizione dei dati?

Durante la fase di acquisizione dei dati, tutti i segnali acquisiti dallo strumento analitico vengono convertiti da segnali analogici a segnali digitali all'interno del rivelatore. Il segnale digitale viene trasmesso a ChemStation in formato elettronico e salvato nel file dati del segnale.

File di dati

Un file di dati contiene un gruppo di file archiviati, per impostazione predefinita, nella directory DATA o in una sottodirectory di questa cartella, come sottodirectory con un nome di file di dati e l'estensione .D. Il nome del file di dati può essere definito manualmente utilizzando fino a 42 caratteri (inclusa l'estensione). Ciascun file contenuto nella directory ha un nome convenzionale (vedere *Convenzioni per la denominazione dei file* nella guida *Concetti e flussi di lavoro*). È possibile aggiungere ulteriori directory di dati utilizzando le impostazioni **Preferences**.

Tabella 1 File di dati

Nome	Description
*.CH	File di dati relativi a segnali cromatografici/elettroferografici. Il nome del file comprende il tipo di modulo o di rivelatore oltre all'identificazione del segnale o del canale. Ad esempio in ADC1A.CH, ADC indica il tipo di modulo, 1 il numero di modulo e A l'identificatore di segnale, mentre .CH è l'estensione cromatografica.
*.UV	File di dati relativi a spettri UV. Contiene il tipo di rivelatore e il numero di dispositivi (solo con rivelatore a serie di diodi e rivelatore a fluorescenza).
REPORT.TXT, REPORT.PDF	File di dati di rapporto per i file equivalenti contenenti dati relativi al segnale. Nota: il nome del file PDF può essere diverso se si utilizza la denominazione univoca del file PDF.
Acq.MACAML	Questo file contiene informazioni sul metodo usato durante l'acquisizione dei dati. Le informazioni sono memorizzate in formato ACAML. I file ACAML sono utilizzati da Intelligent Reporting.

Tabella 1 File di dati

Nome	Description
Sequence.ACAM_	Il file contiene i risultati di una singola iniezione. Le informazioni sono memorizzate in formato ACAML. I file ACAML sono utilizzati da Intelligent Reporting.
SAMPLE.MAC o Sample.XML	Questo file viene usato per registrare i valori di esempio
SAMPLE.MAC.BAC	Backup del file sample.mac originale. Il file .bac viene creato durante la rielaborazione, quando i parametri di esempio (come i moltiplicatori) sono aggiornati per la prima volta. Contiene i valori originali del campione usati durante l'acquisizione.
RUN.LOG	Voci del registro elettronico generate durante un'analisi. Il registro elettronico tiene traccia dell'analisi. Tutti i messaggi di errore e le modifiche di stato significative di ChemStation vengono salvati nel registro elettronico.
LCDIAG.REG	Solo per cromatografia liquida. Contiene curve relative allo strumento (gradiente, temperatura, pressione, ecc.), volume di iniezione e descrizioni del solvente.
ACQRES.REG	Contiene informazioni sulla colonna. Per i gascromatografi contiene anche il volume di iniezione.
GLPSAVE.REG	Parte del file di dati in cui viene specificato il salvataggio dei dati GLP.
M_INTEV.REG	Contiene gli eventi d'integrazione manuale.

Monitor in linea

Esistono due tipi di monitor in linea, uno relativo ai segnali e uno relativo agli spettri.

Monitor in linea per i segnali

Questo tipo di monitor consente di controllare parecchi segnali e, se supportato da uno strumento, diagrammi relativi alle prestazioni dello stesso, nella stessa finestra. È possibile scegliere i segnali che si desidera visualizzare e programmare il tempo e l'asse di assorbanza. Per i rivelatori che supportano questa funzione è disponibile un tasto di equilibrazione.

Si può visualizzare la risposta di segnale assoluto tenendo premuto il tasto sinistro del mouse nella finestra del monitor.

Monitor in linea per spettri

Il monitor in linea per spettri illustra l'assorbanza come funzione della lunghezza d'onda. È possibile regolare sia l'intervallo di lunghezze d'onda visualizzato sia la scala di assorbanza.

Registro elettronico

Visualizza messaggi creati dal sistema analitico. Possono essere messaggi di errore, di sistema o di segnalazione di eventi in un modulo. Il registro elettronico riporta questi eventi indipendentemente dal fatto che possano essere o meno visualizzati. Per ottenere ulteriori informazioni su un evento presente nel registro elettronico, fare doppio clic sulla riga desiderata per visualizzare un testo descrittivo.

Informazioni sullo stato

Stato della ChemStation

La finestra Status (Stato) illustra un riepilogo delle condizioni del software della ChemStation.

Quando viene eseguita una sola analisi:

- sulla prima riga della finestra Status (Stato) della ChemStation viene visualizzato Run in Progress (Analisi in corso);
- sulla seconda riga viene visualizzato lo stato del metodo corrente;
- sulla terza riga viene visualizzato il nome del file di dati grezzi insieme al tempo effettivo dell'analisi in minuti. Per uno strumento GC vengono visualizzati anche i file relativi agli iniettori anteriore e posteriore.

Le finestre Instrument Status (Stato strumento) forniscono informazioni sui moduli ed i rivelatori dello strumento. Mostrano anche le condizioni dei singoli componenti e dove necessario anche dati su pressione, gradiente e flusso.

Barra di stato

L'interfaccia grafica per l'utente di ChemStation comprende barre di strumenti e una barra di stato nella visualizzazione Controllo metodo ed esecuzione di ChemStation. La barra di stato comprende un campo che visualizza lo stato del sistema ed informazioni sul metodo corrente caricato e sulla sequenza. Se questi ultimi sono stati modificati dopo il caricamento, sono contrassegnati da un ingranaggio giallo. Per un modulo Agilent Serie 1100/1200, il simbolo EMF giallo indica che i limiti di utilizzo per le parti di consumo (ad esempio la lampada), sono stati superati.

Diagramma di sistema

Se supportato dagli strumenti analitici configurati (ad esempio i moduli Agilent Serie 1200 Infinity per LC o il gascromatografo Agilent Serie 6890) è possibile visualizzare un diagramma del sistema gestito dalla ChemStation. Ciò consente di controllare rapidamente le condizioni del sistema. Scegliere System Diagram dal menu di View di Method o Run Control View per attivare il diagramma. Si tratta di una rappresentazione grafica dell'intero sistema della ChemStation. Ogni componente è rappresentato da un'icona. Lo stato viene visualizzato utilizzando il codice di colori descritto di seguito.

Tabella 2 Colori usati per indicare lo stato del modulo o strumento

Colore	Status
grigio scuro	non in linea
grigio chiaro	Standby (es. Lampade spente)
giallo	not ready
verde	pronto
porpora	pre-analisi, post-analisi
blu	in funzione
rosso	errore

Inoltre, è possibile visualizzare una lista delle impostazioni dei parametri in uso. Oltre a fornire una visione generale del sistema, il diagramma consente di accedere velocemente alle finestre di dialogo per impostare i parametri di ogni componente del sistema.

Per ulteriori informazioni sul diagramma del sistema, consultare la parte relativa agli strumenti della Guida in linea.

2 Integrazione

Che cos'è l'integrazione? 17
Gli algoritmi di integrazione della ChemStation 19
- Definizione dei termini 23

Principio di funzionamento 25
Riconoscimento dei picchi 26
- Ampiezza del picco 26
- Filtri di riconoscimento dei picchi 27
- Raggruppamento 28
- Algoritmo di riconoscimento del picco 29
- Picchi fusi 31
- Spalle 32

Collocazione della linea di base 34
- Costruzione della linea di base predefinita 34
- Inizio della linea di base 35
- Fine della linea di base 35
- Penetrazione della linea di base 35
- Rapporto picco-valle 37
- Funzione di definizione della tangente di interpolazione 38
- Picchi non assegnati 44
- Codici di separazione del picco 45

Misurazione dell'area del picco 47
- Determinazione dell'area 47
- Unità e fattori di conversione 49

Eventi di integrazione 50
Eventi di integrazione per tutti i segnali 50
Eventi iniziali 50
Eventi programmati 54
Autointegrazione 57
Integrazione manuale 59

Questo capitolo spiega come effettuare le operazioni di integrazione e illustra gli algoritmi di integrazione della ChemStation. Vengono descritti l'algoritmo di integrazione, l'integrazione e l'integrazione manuale.

Che cos'è l'integrazione?

L'integrazione localizza i picchi in un segnale e calcola le loro dimensioni.

L'integrazione è necessaria per:

- identificazione
- qualificazione
- calibrazione
- quantificazione
- calcolo della purezza dei picchi
- ricerca nella libreria di spettri.

Che cosa fa l'integrazione?

Quando un segnale viene integrato, il software:

- identifica l'inizio e la fine di ogni picco
- trova l'apice di ogni picco, ossia il tempo di ritenzione/migrazione,
- costruisce una linea di base,
- calcola l'area, l'altezza e l'ampiezza del picco.

Questo processo è controllato da parametri chiamati eventi di integrazione.

Capacità dell'integratore

Gli algoritmi di integrazione includono le seguenti capacità:

- autointegrazione, per impostare i parametri di integrazione iniziali;
- capacità di definire tavole personali degli eventi per ogni segnale cromatografico/elettroferografico, in presenza di segnali multipli o di più rivelatori;
- definizione interattiva degli eventi di integrazione che consenta agli utilizzatori di selezionare graficamente i tempi;

- integrazione grafica manuale di cromatogrammi o elettroferogrammi che richiedono l'interpretazione umana (gli eventi possono anche essere registrati nel metodo ed utilizzati come parte delle operazioni automatizzate);
- annotazione dei risultati dell'integrazione,
- definizione dei parametri dell'integratore per impostare o modificare le impostazioni di base per scarto di area o altezza, ampiezza dei picchi, sensibilità del flesso, rilevazione della spalla, correzione della linea di base e rilevazione della tangente di interpolazione anteriore/posteriore,
- parametri di controllo della linea di base, come hold baseline, force baseline, baseline at all valleys, baseline at next valley ecc.;
- controllo della sommatoria delle aree;
- riconoscimento di picchi negativi;
- rilevazione e definizione del picco del solvente
- comandi di controllo dell'integratore che definiscano gli intervalli dei tempi di ritenzione/migrazione per il funzionamento dell'integratore;
- collocazione delle spalle dei picchi utilizzando la derivata seconda,
- miglioramento del campionamento di punti di dati non equidistanti per ottenere migliori prestazioni con file di dati DAD LC ricostruiti da spettri DAD.

Gli algoritmi di integrazione della ChemStation

Panoramica

Per integrare un cromatogramma/elettroferogramma l'integratore:

1. definisce la linea di base iniziale;
2. controlla continuamente ed aggiorna la linea di base;
3. identifica il tempo di inizio di un picco,
4. trova l'apice di ogni picco,
5. identifica il tempo di fine del picco,
6. costruisce una linea di base,
7. calcola l'area, l'altezza e l'ampiezza di ciascun picco.

Questo processo è controllato da **integration events**. Gli eventi più importanti sono la sensibilità iniziale della pendenza, l'ampiezza del picco, la correzione della linea di base, lo scarto di area e lo scarto dell'altezza. Il software consente di impostare valori iniziali per questi ed altri eventi. I valori iniziali hanno effetto all'inizio del cromatogramma. Inoltre, la funzione di integrazione automatica fornisce un set di eventi iniziali che possono essere ottimizzati in una fase successiva.

Benché nella maggior parte dei casi, gli eventi iniziali forniscano buoni risultati di integrazione per l'intero cromatogramma, è talvolta necessario un maggiore controllo sul processo di integrazione.

Il software consente di controllare come viene eseguita l'integrazione e di programmare nuovi eventi di integrazione in momenti appropriati del cromatogramma.

Per ulteriori informazioni, consultare la sezione “Eventi iniziali” , pagina 50.

Definizione della linea di base iniziale

Poiché le condizioni della linea di base variano in funzione dell'applicazione e dell'hardware del rivelatore, l'integratore utilizza parametri provenienti sia dagli eventi di integrazione che dal file di dati per ottimizzare la linea di base.

Prima che l'integratore possa integrare i picchi, deve stabilire un **baseline point**. Quando inizia l'analisi, l'integratore stabilisce un livello iniziale della linea di base considerando il primo punto di dati come un punto della linea di base potenziale. Quindi, tenta di ridefinire il punto iniziale basandosi sulla media del segnale di input. Se l'integratore non ottiene un punto iniziale della linea di base ridefinito, mantiene il primo punto di dati come punto potenziale di inizio della linea di base.

Monitoraggio della linea di base

L'integratore campiona i dati digitali, nel corso dell'analisi, ad una percentuale determinata dal valore iniziale di ampiezza del picco o da quello calcolato. Ogni punto di dati viene considerato come potenziale punto della linea di base.

L'integratore determina un *inviluppo della linea di base* dalla pendenza della linea di base utilizzando un algoritmo di monitoraggio dove la pendenza è determinata con la derivata prima e la curvatura con la derivata seconda. L'inviluppo della linea di base può essere visualizzato come cono, con il suo vertice sul punto di dati corrente. I livelli di accettazione superiore e inferiore del cono sono:

- + ascendente + curvatura + linea di base la cui inclinazione deve essere inferiore al livello di soglia,
- - discendente - curvatura + linea di base la cui inclinazione deve essere più positiva (ovvero, meno negativa) del livello di soglia.

Non appena i nuovi punti di dati vengono accettati, il cono si muove in avanti fino a che non si verifica un'interruzione.

Per essere accettato come punto della linea di base, un punto di dati deve soddisfare le seguenti condizioni:

- deve trovarsi all'interno dell'inviluppo della linea di base definito;

- la curvatura della linea di base al punto di dati (determinata da filtri in derivata) deve trovarsi al di sotto di un valore critico, determinato dall'impostazione corrente della sensibilità della pendenza.

Il punto della linea di base, stabilito all'inizio dell'analisi, viene continuamente reimpostato con una frequenza determinata dall'ampiezza del picco, come media variabile dei punti di dati che rientrano nell'inviluppo della linea di base per un periodo determinato dall'ampiezza del picco. L'integratore rintraccia e reimposta periodicamente la linea di base per compensare la deriva, fino a che non viene rivelato un picco in pendenza ascendente.

Collocazione della linea di base

L'integratore colloca la linea di base cromatografica/elettroferografica durante l'analisi, a una frequenza determinata dal valore dell'ampiezza del picco. Quando l'integratore ha campionato un certo numero di punti di dati, reimposta la linea di base dal punto iniziale a quello corrente. L'integratore riprende a controllare la linea di base sul set successivo di punti di dati e reimposta la linea di base. Il processo continua fino a che l'integratore non identifica l'inizio di un picco.

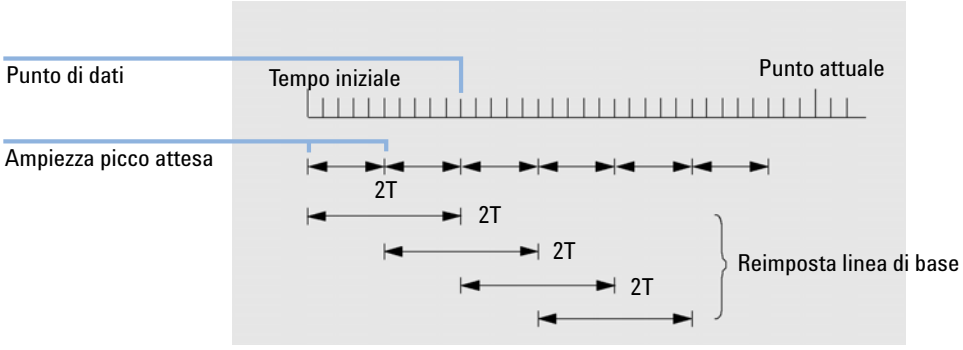

Figura 1 Linea di base

All'avvio dell'esecuzione viene usato il primo punto di dati. Questo punto della linea di base viene periodicamente reimpostato in base alla formula seguente:

Le aree vengono sommate per il tempo T (ampiezza picco prevista). Questo tempo non può mai essere inferiore a un punto di dati. L'operazione continua finché esistono le condizioni della linea di base. Vengono prese in considera-

zione sia la pendenza che la curvatura. Se entrambe sono inferiori alla soglia, vengono sommate due aree e confrontate con la linea di base precedente. Se il nuovo valore è inferiore alla linea di base precedente, tale valore sostituisce immediatamente quello esistente. Se il nuovo valore è maggiore del precedente, tale valore viene archiviato come possibile nuovo valore per la linea di base e viene confermato se un ulteriore valore soddisfa i criteri di piattezza di pendenza e curvatura. Se sono consentiti picchi negativi, questa ultima limitazione non viene applicata. Durante il calcolo della linea di base, deve essere eseguito un controllo per l'esame di solventi a incremento veloce. L'incremento potrebbe essere troppo veloce per il rilevamento della pendenza ascendente. Al momento della conferma della pendenza ascendente, il criterio del solvente potrebbe non essere più valido. La linea di base passa per il primo punto di dati al tempo 1. Se il segnale è sulla base, viene sostituito dalla media 2 T. La linea di base viene quindi reimpostata ogni T (vedere la Figura 1, pagina 21).

Identificazione dei punti cardinali di un picco

L'integratore stabilisce che un picco potrebbe iniziare quando potenziali punti della linea di base si trovano al di fuori della stessa e la curvatura della linea di base supera un determinato valore, come stabilito dal parametro di sensibilità della pendenza dell'integratore. Se queste condizioni persistono, l'integratore decide che il punto si trova sulla curva ascendente e quindi il picco viene elaborato.

Inizio

1. Pendenza e curvatura nei limiti: continuare il controllo della linea di base.
2. Pendenza e curvatura al di sopra dei limiti: possibilità di un picco.
3. La pendenza rimane al di sopra dei limiti: picco riconosciuto, punto di inizio del picco definito.
4. La curvatura diventa negativa: punto di flesso anteriore definito.

Apice

1. La pendenza passa dallo zero e diventa negativa: apice del picco, apice del picco definito.
2. La curvatura diventa positiva: punto di flesso posteriore definito.

Fine

1 Pendenza e curvatura nei limiti: ci si trova in prossimità della fine del picco.
2 La pendenza e la curvatura rimangono nei limiti: fine del picco definita.
3 L'integratore ritorna alla modalità di monitoraggio della linea di base.

Definizione dei termini

Punti cardinali

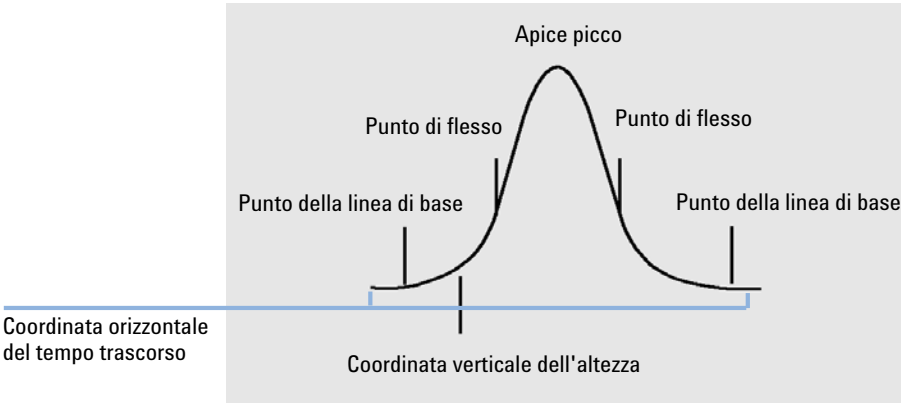

Figura 2 Punti cardinali

Picco di solvente

Il picco di solvente, che è generalmente un picco molto grande di nessuna importanza analitica, normalmente non viene integrato. Tuttavia, quando picchi di piccole dimensioni ma di interesse per l'analisi eluiscono vicino al picco di solvente, ad esempio sulla coda, possono essere impostate condizioni di integrazione speciali per calcolare le aree corrette del contributo della coda del picco di solvente.

Spalla (anteriore, posteriore)

Le spalle si verificano quando due picchi eluiscono in tempi talmente ravvicinati che non esiste avvallamento fra loro e rimangono non risolti. Le spalle possono prodursi sul bordo anteriore del picco o su quello posteriore. Quando si rilevano spalle, esse possono essere integrate utilizzando tangenti di interpolazione o perpendicolari.

Pendenza

La pendenza di un picco, che denota la modifica della concentrazione di un composto rispetto al tempo, viene utilizzata per determinare la comparsa di un picco, il suo apice e la sua fine.

Principio di funzionamento

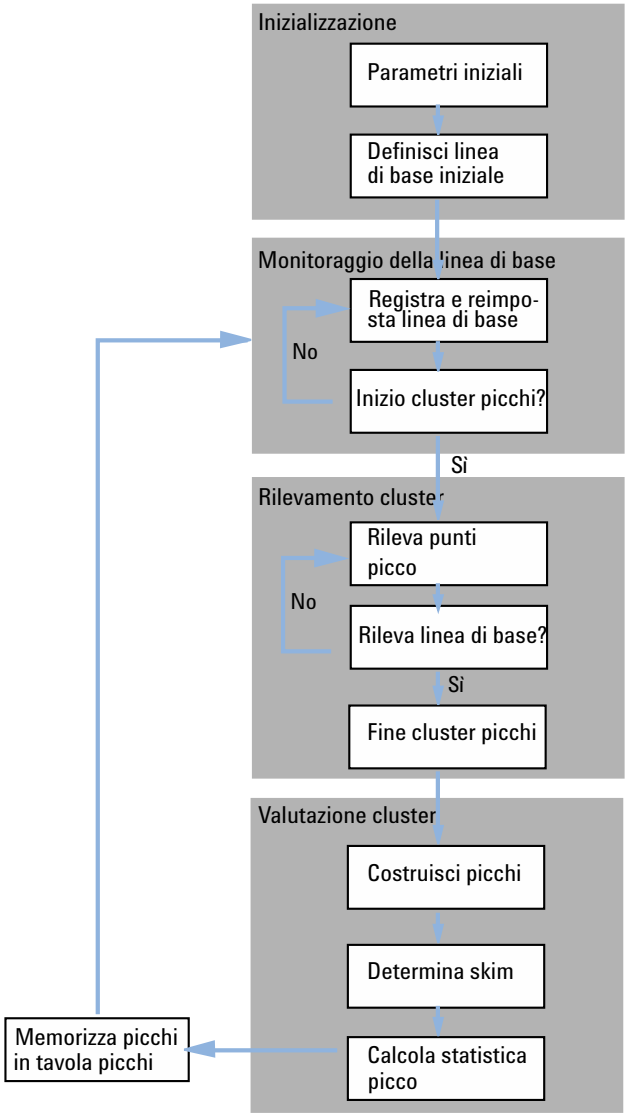

Figura 3 Diagramma di flusso dell'integratore

Riconoscimento dei picchi

L'integratore utilizza diversi strumenti per riconoscere e caratterizzare un picco:

- ampiezza del picco;
- filtri di riconoscimento dei picchi;
- raggruppamento;
- algoritmo di riconoscimento del picco;
- algoritmo dell'apice del picco;
- calcoli non gaussiani (ad esempio scodamento, fusione dei picchi).

Ampiezza del picco

Durante l'integrazione, l'ampiezza del picco viene calcolata utilizzando l'area regolata e l'altezza del picco:

Larghezza = Area regolata / Altezza regolata

Oppure, se sono disponibili i punti di flesso, viene calcolata utilizzando l'ampiezza fra i punti di flesso.

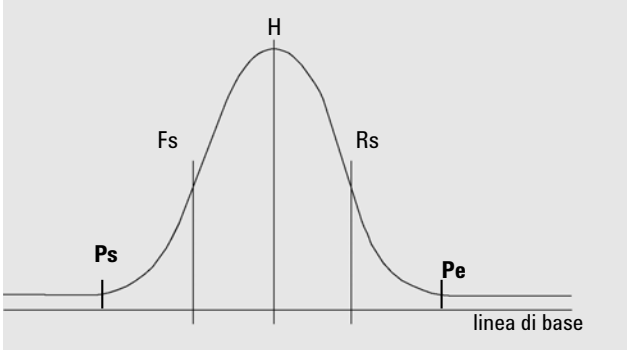

Figura 4 Calcolo dell'ampiezza del picco

Nella figura precedente, l'area totale, A, è la somma delle aree dall'inizio del picco (Ps) alla fine del picco (Pe), regolata per la linea di base. Fs è la pendenza anteriore sul punto di flesso; Rs è la pendenza posteriore sul punto di flesso.

L'impostazione dell'ampiezza del picco controlla la capacità dell'integratore di distinguere i picchi dal rumore della linea di base. Per ottenere buone prestazioni, l'ampiezza deve essere impostata vicino a quella dei picchi cromatografici/elettroferografici reali.

L'ampiezza dei picchi può essere modificata in tre modi:

- Prima dell'esecuzione, è possibile specificare l'ampiezza iniziale del picco
- Durante l'esecuzione, l'integratore aggiorna automaticamente l'ampiezza del picco come necessario per mantenere una buona corrispondenza con i filtri di riconoscimento dei picchi
- Durante l'esecuzione, è possibile reimpostare o modificare l'ampiezza del picco utilizzando un evento programmato sul tempo.

Per la definizione di ampiezza del picco utilizzata dai calcoli di idoneità del sistema, consultare la sezione "Valutazione dell'idoneità del sistema" , pagina 99.

Filtri di riconoscimento dei picchi

L'integratore dispone di filtri di riconoscimento dei picchi che possono essere utilizzati per il riconoscimento dei picchi mediante la rilevazione delle modifiche di curvatura e pendenza all'interno di un gruppo di punti di dati contigui. Questi filtri contengono la derivata prima (per misurare la pendenza) e la derivata seconda (per misurare la curvatura) dei punti esaminati dall'integratore. I filtri di riconoscimento sono:

Filtro 1 Pendenza (curvatura) di due (tre) punti di dati contigui

Filtro 2 Pendenza di quattro punti di dati contigui e curvatura di tre punti di dati non contigui

Filtro 3 Pendenza di otto punti di dati contigui e curvatura di tre punti di dati non contigui

Il filtro reale utilizzato è determinato dall'impostazione dell'ampiezza del picco. Ad esempio, all'inizio dell'analisi, è possibile utilizzare Filtro 1. Se durante l'analisi l'ampiezza del picco aumenta, il filtro viene impostato prima su Filtro 2, quindi su Filtro 3. Per ottenere buone prestazioni dai filtri di riconoscimento, l'ampiezza del picco deve essere impostata su un valore prossimo all'ampiezza dei picchi reali cromatografici/elettroferografici. Durante l'analisi, l'integratore aggiornerà l'ampiezza del picco secondo necessità per ottimizzare l'integrazione.

L'integratore calcola l'ampiezza del picco aggiornata in vari modi, in base alla configurazione dello strumento:

Per le configurazioni LC/CE, il calcolo predefinito dell'ampiezza del picco utilizza un calcolo composito:

0.3 x (Right Inflection Point - Left Inflection point) + 0.7 x Area/Height

Per le configurazioni GC, il calcolo predefinito dell'ampiezza del picco utilizza l'area/altezza. Questo calcolo non sopravvaluta l'ampiezza del picco quando i picchi sono fusi sopra la metà dell'altezza.

In alcuni tipi di analisi, ad esempio GC isotermico e LC isocratico, i picchi diventano significativamente più ampi con il progredire dell'analisi. Per compensare questa situazione, l'integratore aggiorna l'ampiezza automaticamente mentre i picchi diventano più ampi durante l'analisi. Lo strumento effettua questa operazione automaticamente, a meno che l'aggiornamento non sia stato disabilitato con un evento di ampiezza fissa del picco programmato a tempo.

L'aggiornamento dell'ampiezza del picco viene calcolato come segue:

0,75 x (ampiezza del picco esistente) + 0,25 x (ampiezza del picco attuale)

Raggruppamento

Il raggruppamento è il mezzo tramite il quale l'integratore aumenta l'ampiezza all'interno del raggio di azione dei filtri di riconoscimento dei picchi per mantenere una buona selettività.

L'integratore non può aumentare senza limiti l'ampiezza del picco per allargare i picchi all'infinito. Alla fine, i picchi diventano così ampi che i filtri di riconoscimento potrebbero non essere più in grado di vederli. Per superare

questa limitazione, l'integratore raggruppa i punti di dati restringendo i picchi e mantenendo al contempo la stessa area.

Quando i dati vengono raggruppati, i punti di dati vengono raggruppati come due elevato alla potenza di raggruppamento, ovvero non raggruppati = 1x, raggruppati una volta = 2x, raggruppati due volte = 4x e così via.

Il raggruppamento tiene conto della velocità di campionamento e dell'ampiezza del picco. L'integratore utilizza questi parametri per impostare il fattore di raggruppamento e fornire il numero appropriato di punti dati Tabella 3, pagina 29.

Il raggruppamento si effettua alla seconda potenza in base all'ampiezza attesa o verificata. L'algoritmo di raggruppamento è riassunto in Tabella 3, pagina 29.

Tabella 3 Criteri di raggruppamento

Ampiezza picco attesa	Filtro(i) utilizzato(i)	Raggruppamento
0 - 10 punti dati	Primo	Nessuno
8 - 16 punti dati	Secondo	Nessuno
12 - 24 punti dati	Terzo	Nessuno
16 - 32 punti dati	Secondo	Una volta
24 - 48 punti dati	Terzo	Una volta
32 - 96 punti dati	Terzo, secondo	Due volte
64 - 192 punti dati	Terzo, secondo	Tre volte

Algoritmo di riconoscimento del picco

L'integratore identifica l'inizio del picco con un punto sulla linea di base determinato dall'algoritmo di riconoscimento del picco. L'algoritmo di riconoscimento del picco confronta dapprima gli output dei filtri di riconoscimento dei picchi con il valore della sensibilità iniziale della pendenza in modo da aumentare o diminuire l'accumulatore della curva ascendente. L'integratore dichiara il punto in cui il valore dell'accumulatore di pendenza ascendente è ≥15 come punto che indica che un picco è iniziato.

Inizio picco

Nella Tabella 4, pagina 30 l'ampiezza dei picchi prevista determina quali valori di pendenza del filtro e di curvatura devono essere confrontati con il valore di sensibilità della pendenza. Ad esempio, i numeri della colonna Filtro 1 vengono aggiunti all'accumulatore di pendenza ascendente quando l'ampiezza del picco prevista è ridotta. Se l'ampiezza del picco prevista aumenta, vengono utilizzati prima i numeri della colonna Filtro 2, quindi quelli della colonna Filtro 3.

Quando il valore dell'accumulatore di pendenza ascendente è ≥15, l'algoritmo presuppone che il picco stia per iniziare.

Tabella 4 Valori di incremento dell'accumulatore in pendenza ascendente

Derivata Filtro 1 - 3 Output a fronte della sensibilità di pendenza	Filtro 1	Filtro 2	Filtro 3
Pendenza > Sensibilità pendenza	+8	+5	+3
Curvatura > Sensibilità pendenza	+0	+2	+1
Pendenza < (-) Sensibilità pendenza	-8	-5	-3
Pendenza < |Sensibilità pendenza|	-4	-2	-1
Curvatura < (-) Sensibilità pendenza	-0	-2	-1

Fine picco

Nella Tabella 5, pagina 31 l'ampiezza dei picchi prevista determina quali valori di pendenza del filtro e di curvatura devono essere confrontati con il valore di sensibilità della pendenza. Ad esempio, i numeri della colonna Filtro 1 vengono aggiunti all'accumulatore di pendenza discendente quando l'ampiezza del picco prevista è ridotta. Se l'ampiezza del picco prevista aumenta, vengono utilizzati prima i numeri della colonna Filtro 2, quindi quelli della colonna Filtro 3.

Quando il valore dell'accumulatore di pendenza discendente è ≥15, l'algoritmo presuppone che il picco stia per terminare.

Tabella 5 Valori di incremento dell'accumulatore di pendenza discendente

Derivata Filtro 1 - 3 Output a fronte della sensibilità di pendenza	Filtro 1	Filtro 2	Filtro 3
Pendenza < (-) Sensibilità pendenza	+8	+5	+3
Curvatura < (-) Sensibilità pendenza	+0	+2	+1
Pendenza > Sensibilità pendenza	-11	-7	-4
Pendenza > |Sensibilità pendenza|	-28	-18	-11
Curvatura > Sensibilità pendenza	-0	-2	-1

Algoritmo dell'apice del picco

L'apice del picco viene riconosciuto nei punti più elevati del cromatogramma costruendo una parabola che passa attraverso i punti di dati più elevati.

Picchi fusi

La fusione dei picchi si verifica quando un picco inizia prima che sia stata trovata la fine di un altro picco. La figura illustra come l'integratore gestisce i picchi fusi.

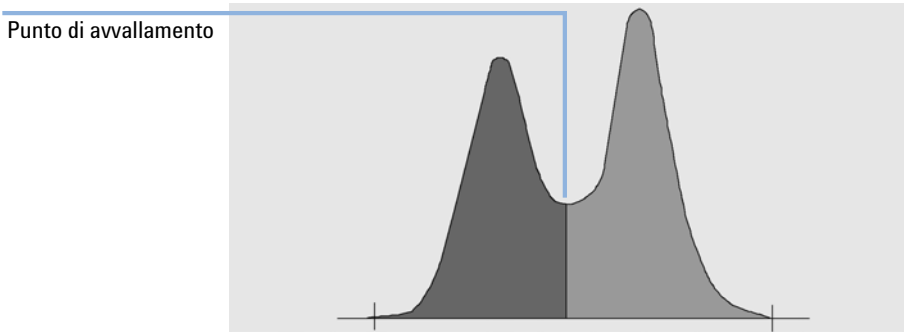

Figura 5 Picchi fusi

L'integratore elabora i picchi fusi come segue:

1 Effettua la sommatoria dell'area del primo picco fino al punto di avvallamento.

2 Al punto di avvallamento la sommatoria del primo picco termina ed inizia la sommatoria del secondo picco.

3 Quando l'integratore individua la fine del secondo picco la sommatoria delle aree termina. Questo processo può essere visualizzato separando i picchi fusi e tracciando una perpendicolare dal punto di avvallamento fra i due picchi.

Spalle

Si tratta di picchi non risolti del bordo anteriore o posteriore di un picco più grande. Quando è presente una spalla, non si tratta di una valle vera e propria, cioè di una pendenza negativa seguita da una positiva. Un picco può avere un numero qualsiasi di spalle anteriori e/o posteriori.

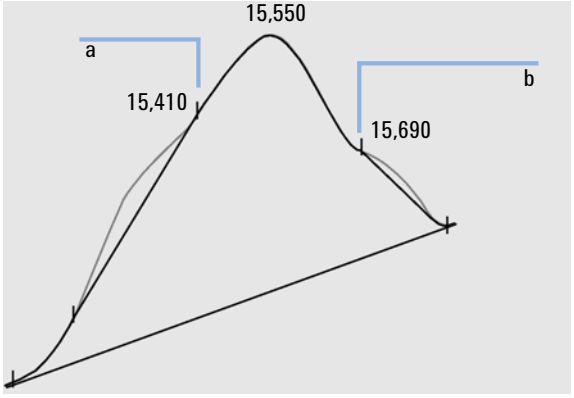

Figura 6 Spalle del picco

Le spalle vengono individuate dalla curvatura del picco alla derivata seconda. Quando la curvatura è ridotta a zero, l'integratore identifica un punto di flesso simile ai punti "a" e "b" nella Figura 6, pagina 32.

- Una potenziale spalla anteriore esiste quando viene individuato un secondo punto di flesso prima dell'apice del picco. Se la spalla è confermata, l'inizio del punto di spalla viene stabilito al punto massimo di curvatura positiva prima del punto di flesso.

- Una potenziale spalla posteriore esiste quando viene individuato un secondo punto di flesso prima della fine del picco o della valle. Se confermata, l'inizio del punto di spalla viene stabilito e impostato sul punto corrispondente dal punto di inizio alla curva.

Il tempo di ritenzione/migrazione è determinato dal punto di massima curvatura negativa della spalla. Con un evento di integrazione programmato, l'integratore è in grado di calcolare anche le aree delle spalle come se si trattasse di picchi normali con perpendicolari ai punti di flesso del picco di spalla.

L'area della spalla è sottratta da quella del picco principale.

Le spalle dei picchi possono essere gestite come picchi normali utilizzando gli eventi programmati previsti dall'integratore.

Collocazione della linea di base

Dopo aver completato tutti i cluster di picchi ed aver determinato la linea di base, l'integratore chiede all'algoritmo di collocazione della linea di base di collocare la linea di base utilizzando una tecnica pegs-and-thread. Quest'ultima utilizza correzioni trapezoidali dell'area e proporzionali dell'altezza per normalizzare e mantenere la linea di base più bassa possibile. Gli input all'algoritmo di collocazione della linea di base comprendono anche parametri acquisiti da file di dati e di metodi che identificano il rivelatore e le applicazioni che l'integratore utilizza per ottimizzare i suoi calcoli.

Costruzione della linea di base predefinita

Nel caso più semplice, l'integratore costruisce la linea di base come una serie di segmenti di linea retta fra:

- L'inizio della linea di base
- inizio del picco, punto di avvallamento, punti di fine,
- linea di base del picco

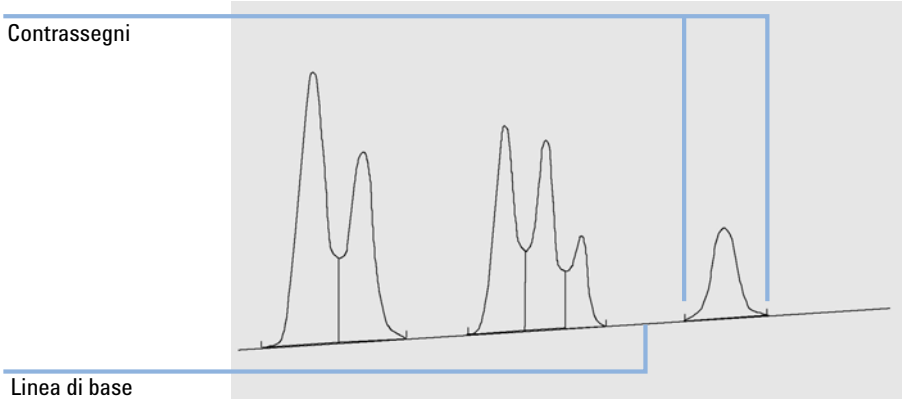

Figura 7 Costruzione della linea di base predefinita

Inizio della linea di base

Se all'inizio dell'analisi non si trova nessuna linea di base, l'inizio verrà stabilito in uno dei modi che seguono:

- Dall'inizio dell'analisi al primo punto della linea di base, se il punto di inizio dell'analisi è inferiore al primo punto della linea di base.
- Dall'inizio dell'analisi al primo punto di avvallamento se il punto di inizio dell'analisi è inferiore alla prima valle.
- Dall'inizio dell'analisi al primo punto di avvallamento, se la prima valle penetra in una linea immaginaria disegnata dall'inizio dell'analisi alla prima linea di base.
- Dall'inizio dell'analisi ad una linea di base orizzontale estesa al primo punto della linea di base.

Fine della linea di base

L'ultimo punto valido della linea di base viene utilizzato per designare la fine della linea di base. Nel caso in cui l'analisi non finisca con la linea di base, la fine della linea di base viene calcolata dall'ultimo punto valido alla deriva stabilita per la linea di base.

Se un picco finisce in una valle evidente, ma il picco seguente si trova al di sotto del valore di scarto dell'area, così com'è stato impostato, la linea di base viene proiettata dall'inizio del picco al punto reale successivo della linea di base. Se un picco inizia allo stesso modo, viene applicata una regola simile.

Penetrazione della linea di base

La penetrazione avviene quando il segnale scende al di sotto della linea di base costruita (punto a nella Figura 8, pagina 36. Se si verifica una penetrazione, quella parte di linea di base in genere viene ridisegnata come mostrano i punti "b" nella Figura 8, pagina 36.

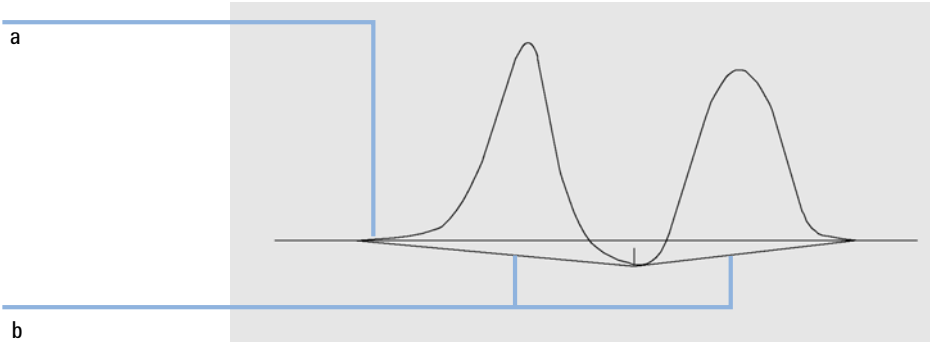

Figura 8 Penetrazione della linea di base

È possibile utilizzare le seguenti opzioni di monitoraggio per rimuovere tutte le penetrazioni della linea di base:

Classical Baseline Tracking (no penetrations)

Quando questa opzione è selezionata, vengono ricercate tutte le penetrazioni in tutti i cluster di picchi. Se vengono trovate penetrazioni, i punti di inizio e/o di fine del picco vengono spostati fino a che non vi sono più penetrazioni (confrontare la linea di base nella Figura 8, pagina 36 e nella Figura 9, pagina 36).

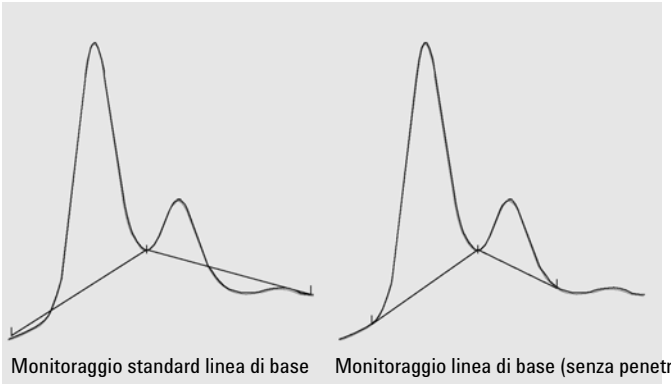

Figura 9 Monitoraggio standard della linea di base e monitoraggio della linea di base (nessuna penetrazione)

NOTA La funzione **Baseline tracking (no penetration)** non è disponibile per i picchi di solvente, con i rispettivi picchi child e spalle.

Monitoraggio avanzato della linea di base

Nella modalità di monitoraggio avanzato della linea di base, l'integratore cerca di ottimizzare le posizioni iniziale e finale dei picchi, ristabilisce la linea di base per un cluster di picchi ed elimina le penetrazioni della linea di base (consultare la sezione Figura 8, pagina 36). In molti casi, questa modalità fornisce una linea di base più stabile, meno dipendente dalla sensibilità della pendenza.

Rapporto picco-valle

Il rapporto picco-valle è una misura della qualità che indica quanto il picco è separato dai picchi di altre sostanze. Questo parametro specificato dall'utente costituisce parte della modalità di monitoraggio avanzato della linea di base. Viene utilizzato per decidere se due picchi che non hanno la stessa separazione della linea di base sono separati da una perpendicolare o da una linea di base di avvallamento. L'integratore calcola il rapporto fra l'altezza (corretta alla linea di base) del picco più piccolo e l'altezza della valle corretta alla linea di base. Quando il rapporto picco-valle è minore del valore specificato, viene utilizzata una linea perpendicolare; altrimenti viene tracciata una linea di base dalla linea di base all'inizio del primo picco alla valle e dalla valle alla linea di base alla fine del secondo picco (confrontare la Figura 9, pagina 36 con la Figura 10, pagina 37).

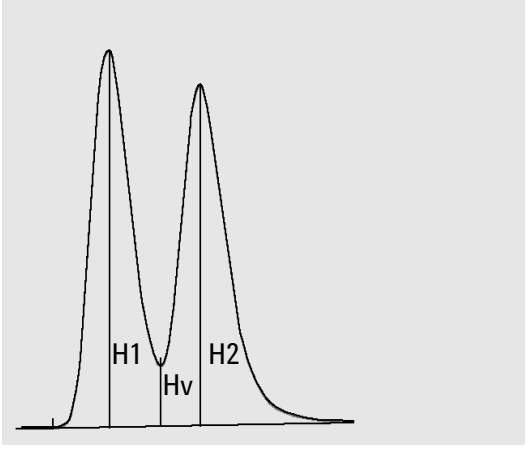

Figura 10 Rapporto picco-valle

I rapporti picco-valle JP ed EP vengono calcolati utilizzando le seguenti equazioni:

H1 ≥ H2, rapporto picco-valle = H2/Hv

e

H1 < H2, rapporto picco-valle = H1/Hv

La Figura 11, pagina 38 mostra come il valore del rapporto picco-valle specificato dall'utente influenza la linea di base.

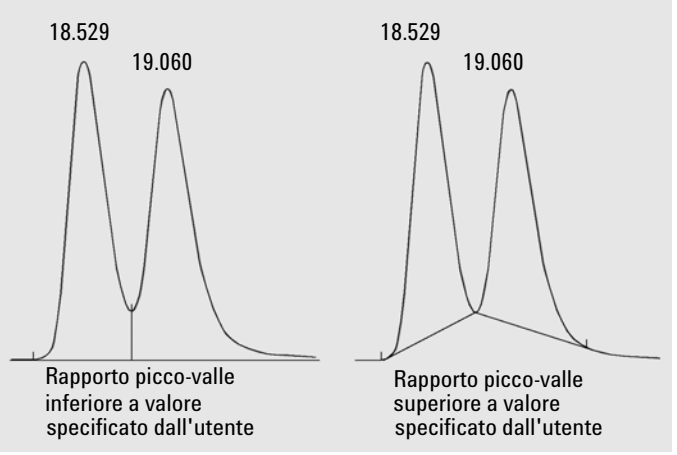

Figura 11 Effetto del rapporto picco-valle sulle linee di base

Funzione di definizione della tangente di interpolazione

È una forma di costruzione della linea di base effettuata per picchi che si trovano sulla pendenza ascendente o discendente di un picco. Quando la definizione della tangente di interpolazione è abilitata, sono disponibili quattro modelli per calcolare aree di picchi appropriate:

- adattamento della curva esponenziale;
- nuovo skim esponenziale;
- skim a linea retta;
- combinazione dei calcoli per la linea retta e quella esponenziale per un migliore adattamento (skim standard).

Adattamento della curva esponenziale

Questo modello di skim traccia una curva usando un'equazione esponenziale fra l'inizio e la fine del picco child. La curva passa sotto ogni picco child che segue il picco parent; l'area sotto la curva di skim viene sottratta dal picco child e aggiunta al picco parent.

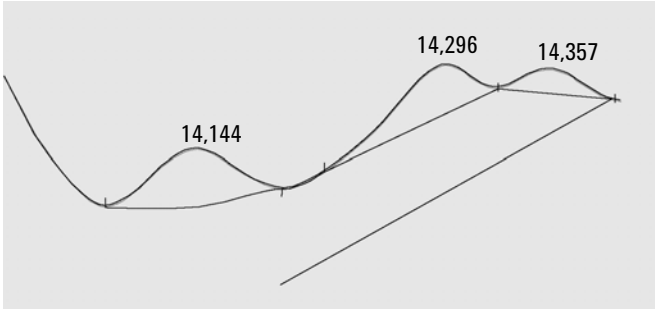

Figura 12 Skim esponenziale

Nuovo modo di adattamento della curva esponenziale

Questo modello di skim traccia una curva utilizzando un'equazione esponenziale per approssimare il bordo anteriore o posteriore del picco parent. La curva passa sotto uno o più picchi che seguono il picco parent (detti picchi child). L'area sotto la curva di skim viene sottratta dai picchi child e aggiunta al picco principale. Più picchi possono essere eliminati usando lo stesso modello esponenziale; tutti i picchi successivi al primo picco child sono separati perpendicolarmente, iniziando alla fine del primo picco child, e sono separati solo fino allo skim.

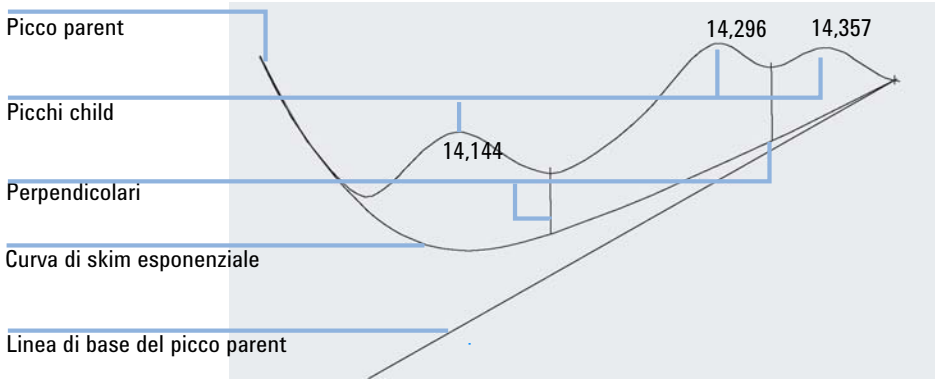

Figura 13 Nuovo modo di skim esponenziale

Skim a linea retta

Questo modello di skim traccia una linea retta fra l'inizio e la fine del picco child. L'altezza dell'inizio del picco child viene corretta per la pendenza del picco parent. L'area sotto la linea retta viene sottratta dal picco child e aggiunta al picco parent.

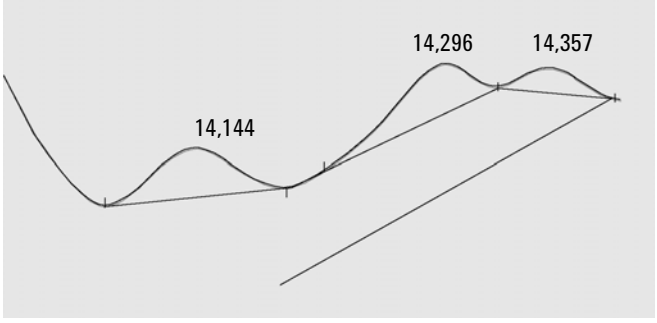

Figura 14 Skim a linea retta

Skim standard

Questo metodo predefinito è una combinazione di calcoli in linea retta ed esponenziali per una migliore corrispondenza.

Il passaggio da un calcolo esponenziale a uno lineare viene effettuato in modo da eliminare discontinuità improvvise delle altezze o delle aree.

- Quando il segnale si trova molto al di sotto della linea di base, il calcolo di adattamento dello scodamento è esponenziale.
- Quando il segnale si trova entro la linea di base, il calcolo di adattamento dello scodamento è quello della linea retta.

I calcoli in combinazione vengono riportati come esponenziali o tangent skim.

Criteri di skim

Due criteri determinano se una linea di skim viene utilizzata per calcolare l'area di un picco child che eluisce sul bordo di coda di un picco parent:

- Rapporto altezza-skim coda
- Rapporto altezza-valle

Questi criteri non sono utilizzati se è attivo un evento programmato a tempo per un esponenziale, o se il picco parent è un picco child in sé. Il codice di separazione fra i picchi parent e child deve essere di tipo **Valley**.

Tail Skim Height Ratio è il rapporto fra l'altezza corretta alla linea di base del picco parent (Hp nella Figura 15, pagina 41) e l'altezza corretta alla linea di base del picco child (Hc). Questo rapporto deve essere maggiore del valore specificato per il picco child da sottoporre a skim.

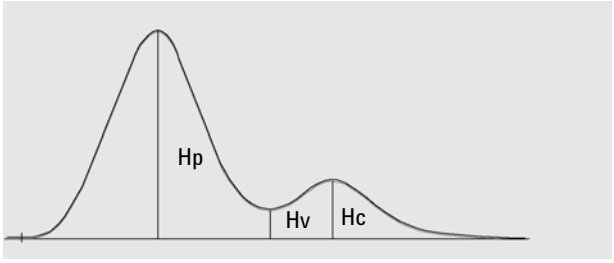

Figura 15 Criteri di skim

È possibile disattivare lo skim esponenziale in tutta l'analisi impostando il valore del rapporto altezza-skim coda su un valore alto o su zero.

Valley Height Ratio è il rapporto dell'altezza del picco child sopra la linea di base (Hc nella Figura 15, pagina 41) e l'altezza della valle sopra la linea di base (Hv nella stessa figura). Questo rapporto deve essere minore del valore specificato per il picco child da sottoporre a skim.

Calcolo dell'adattamento della curva esponenziale per gli skim

La seguente equazione viene utilizzata per calcolare uno skim esponenziale:

$Hb = Ho \times exp\ (- B \times (Tr - To)) + A \times Tr + C$

dove

Hb = Altezza dello skim esponenziale sul tempo Tr

Ho = Altezza (sopra la linea di base) dell'inizio dello skim esponenziale

B = Fattore di decadimento della funzione esponenziale

To = Tempo corrispondente all'inizio dello skim esponenziale

A = Pendenza della linea di base del picco parent

C = Offset della linea di base del picco parent

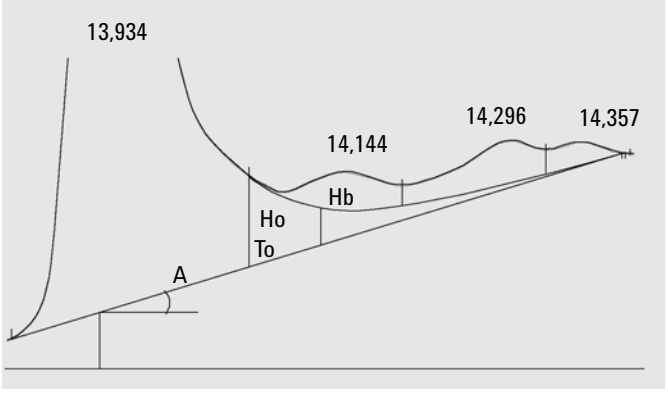

Figura 16 Valori utilizzati per calcolare uno skim esponenziale

Il modello esponenziale viene adattato attraverso la parte della coda del picco parent, immediatamente prima del primo picco child. Figura 17, pagina 43 mostra la curva corretta di un picco child dopo l'applicazione della funzione di definizione della tangente d'interpolazione.

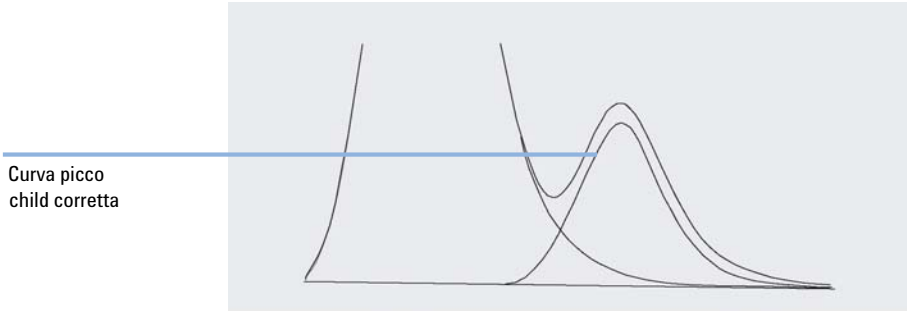

Figura 17 Picco child corretto alla coda

Skim del picco anteriore

Come per i picchi child sulla coda del picco parent, per alcuni picchi sulla parte anteriore/ascendente di un picco, è richiesta un'integrazione speciale. Vedere la Figura 18, pagina 43.

Figura 18 Skim del picco anteriore

Lo skim del picco anteriore viene gestito come lo skim del picco di coda, utilizzando gli stessi modelli di skim.

I criteri di skim sono:

- Rapporto altezza-skim anteriore
- Rapporto altezza-valle

Il rapporto altezza-valle utilizza lo stesso valore sia per lo skim del picco anteriore che per quello del picco di coda (vedere "Rapporto altezza-valle"); il rapporto altezza-skim anteriore viene calcolato con la stessa procedura usata per il rapporto altezza-skim coda (vedere "Rapporto altezza-skim coda"), ma può avere valore diverso.

Picchi non assegnati

Con alcune costruzioni di linea di base si determinano piccole aree al di sopra della linea di base ed al di sotto del segnale, ma che non fanno parte di nessun picco riconosciuto. Di solito queste aree non vengono misurate né riportate. Se la funzione viene attivata queste aree vengono misurate e riportate come picchi non assegnati. Il tempo di ritenzione/migrazione di tali aree è il punto intermedio fra l'inizio e la fine dell'area, come illustrato dalla Figura 19, pagina 44.

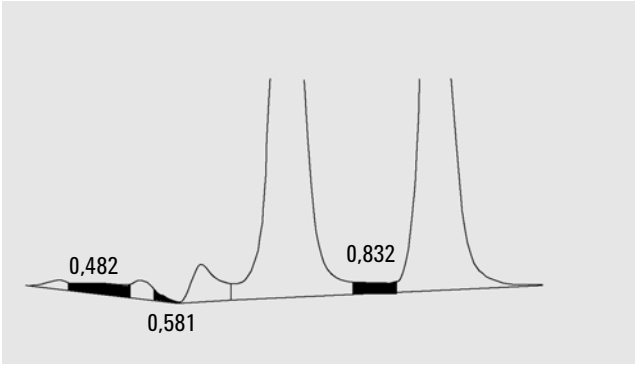

Figura 19 Picchi non assegnati

Codici di separazione del picco

Nei rapporti si assegna ad ogni picco un codice di due, tre o quattro caratteri che descrive come è stato disegnato il segnale della linea di base.

Caratteri 1 e 2

Il primo carattere descrive la linea di base all'inizio del picco e il secondo carattere descrive la linea di base alla fine del picco.

B Il picco inizia o termina sulla linea di base.

V Il picco è iniziato o terminato con una perpendicolare al punto di avvallamento.

P Il picco inizia o termina mentre si verifica una penetrazione della linea di base.

H Il picco è iniziato o terminato su una linea di base orizzontale forzata.

F Il picco è iniziato o terminato su un punto forzato.

M Il picco è stato integrato manualmente.

U Il picco non è stato assegnato.

È possibile aggiungere ulteriori contrassegni (in ordine di precedenza):

Carattere 3

D Il picco è stato distorto.

A L'integrazione è stata interrotta.

U Si è verificata una condizione al di sotto dell'intervallo.

O Si è verificata una condizione al di sopra dell'intervallo.

Carattere 4

Il quarto carattere descrive il tipo di picco:

S Si tratta di un picco di solvente.

N Si tratta di un picco negativo.

+ Si tratta di un picco ottenuto da sommatoria di aree.

T Picco tangent-skim (skim standard).

X Picco tangent-skim (skim esponenziale vecchia modalità).

E Picco tangent-skim (skim esponenziale nuova modalità).

m Picco definito da linea di base manuale.

n Picco negativo definito da linea di base manuale.

t Picco tangent-skim definito da linea di base manuale.

R Questo è un picco di solvente ricalcolato sul picco principale.

f Picco definito da una tangente alla spalla anteriore.

b Picco definito da una tangente alla spalla posteriore.

F Picco definito da una perpendicolare sulla spalla anteriore.

B Picco definito da una perpendicolare sulla spalla posteriore.

U Il picco non è assegnato.

Misurazione dell'area del picco

L'ultima fase dell'integrazione del picco è la determinazione dell'area finale del picco.

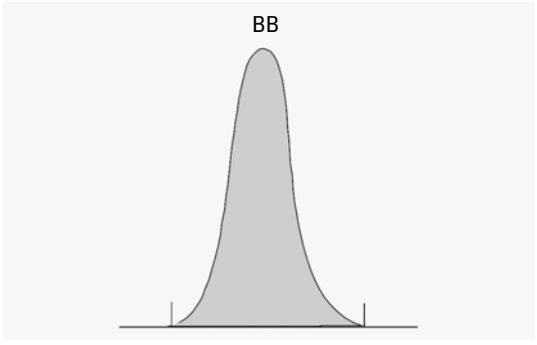

Figura 20 Misurazione dell'area di picchi da linea di base a linea di base

Nel caso di un semplice picco isolato, l'area viene determinata come quella al di sopra della linea di base, fra l'inizio e la fine del picco (identificate da appositi segni).

Determinazione dell'area

L'area calcolata dall'integratore durante l'integrazione viene determinata nei seguenti modi:

- per i picchi da linea di base a linea di base (BB), l'area sopra la linea di base fra l'inizio e la fine del picco, come nella Figura 20, pagina 47,
- per i picchi da valle a valle (VV), l'area sopra la linea di base, segmentata con linee perpendicolari dai punti di avvallamento, come nella Figura 21, pagina 48,

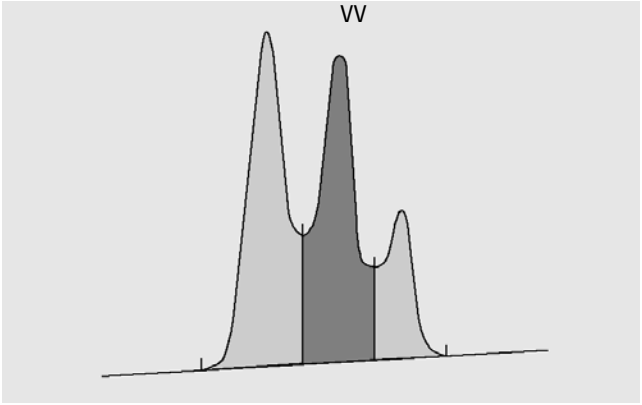

Figura 21 Misurazione dell'area dei picchi da valle a valle

- per i picchi tangenti (T), l'area al di sopra della linea di base reimpostata,
- per i picchi di solvente (S), l'area al di sopra dell'estensione orizzontale dall'ultimo punto trovato sulla linea di base ed al di sotto della linea di base reimpostata per i picchi tangenti (T). Un picco di solvente può venire visualizzato troppo lentamente per essere riconosciuto, o può esistere un gruppo di picchi che fanno parte dell'analisi ma che si pensa debbano essere trattati come solvente con un gruppo di picchi successivi. Ciò di solito coinvolge un gruppo di picchi fusi dove il primo è maggiore dei successivi. Il semplice fatto di tracciare la perpendicolare metterebbe in evidenza gli ultimi picchi, dato che si trovano effettivamente sulla coda del primo. Se si desidera riconoscere il primo picco come solvente, si eliminano tutti gli altri dalla coda,
- i picchi negativi che si trovano sotto la linea di base hanno comunque un'area positiva, come mostrato in Figura 22, pagina 49.

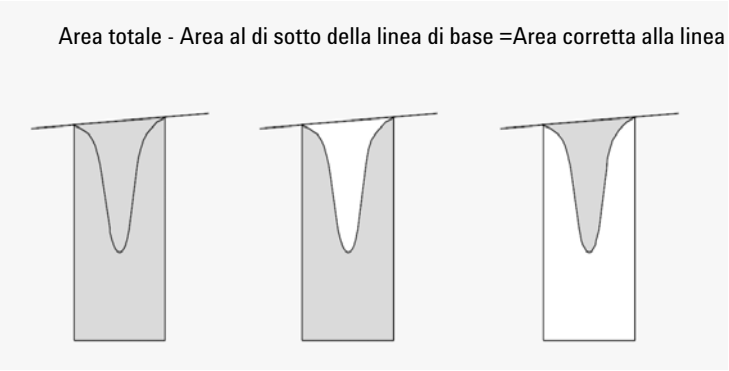

Figura 22 Misurazione dell'area per i picchi negativi

Unità e fattori di conversione

Esternamente, i dati contengono una serie di punti di dati. Possono essere dati campionati o integrati. Nel caso di dati integrati, ciascun punto di dati corrisponde a un'area, che viene espressa come *Altezza* × *Tempo*. Nel caso di dati campionati, ciascun punto di dati corrisponde a un'altezza.

Di conseguenza, nel caso di dati integrati, l'altezza è un'entità calcolata, ottenuta dividendo l'area per il tempo trascorso dal precedente punto di dati. Nel caso di dati campionati, l'area viene calcolata moltiplicando i dati per il tempo trascorso dal precedente punto di dati.

Il calcolo di integrazione utilizza entrambe le entità. Le unità utilizzate all'interno dell'integratore sono: *conteggi* × *millisecondi* per l'area e *conteggi* per l'altezza. Questa soluzione garantisce una base comune per le troncature degli interi, se richiesto. Le misurazioni del tempo, dell'area e dell'altezza sono riportate in unità fisiche reali, indipendentemente dal modo in cui sono misurate, calcolate e archiviate nel software.

Eventi di integrazione

L'integratore fornisce all'utente vari eventi di integrazione iniziali e programmati. Molti eventi sono di tipo on/off, start/stop.

Eventi di integrazione per tutti i segnali

Per tutti i segnali vengono forniti gli eventi seguenti:

- Modalità Tangente di interpolazione
- Rapporto altezza-skim coda del picco
- Rapporto altezza-skim del picco anteriore
- Rapporto valle-coda
- Correzione della linea di base
- Rapporto picco-valle

Eventi iniziali

Initial Peak Width L'ampiezza iniziale del picco imposta l'ampiezza interna del picco su questo valore per l'inizio dell'analisi. Questo valore iniziale viene usato per scalare l'accumulatore che rivela la curva ascendente, la curva discendente e la coda del picco. Se necessario, l'integratore aggiorna l'ampiezza del picco durante l'analisi per ottimizzare l'integrazione. L'ampiezza del picco viene specificata in unità di tempo che corrispondono all'ampiezza del picco a metà altezza del primo picco previsto (escluso il picco del solvente).

Slope Sensitivity La sensibilità della pendenza è l'impostazione della sensibilità del picco. Questa impostazione cambia su scala lineare.

Height reject Lo scarto dell'altezza imposta il rifiuto del picco in base all'altezza finale. Nessun picco con un'altezza inferiore all'altezza minima impostata verrà inserito nel rapporto.

Area reject Lo scarto dell'area imposta il rifiuto del picco in base all'area finale. Nessun picco con un'area inferiore all'area minima impostata verrà inserito nel rapporto.

Shoulder detection Quando la rilevazione delle spalle è attiva, l'integratore individua le spalle utilizzando la curvatura del picco come viene data dalla derivata seconda. Se la curvatura assume un valore zero, l'integratore identifica il punto di flesso come possibile spalla. Se l'integratore identifica un altro punto di flesso prima dell'apice del picco, si tratta di una spalla.

Peak Width

Controlla la selettività dell'integratore in modo che possa distinguere i picchi dal rumore della linea di base. Per ottenere buoni risultati, l'ampiezza del picco deve essere impostata su un valore prossimo all'ampiezza a metà altezza dei picchi cromatografici/elettroferografici reali. Se necessario, l'integratore aggiorna l'ampiezza del picco durante l'analisi per ottimizzare l'integrazione.

Come scegliere il valore dell'ampiezza del picco

Scegliere l'impostazione che fornisce un filtro sufficiente per distinguere il rumore di fondo dai picchi senza distorcere le informazioni fornite dal segnale.

- Per scegliere un'ampiezza iniziale adatta a un solo picco di interesse, utilizzare l'ampiezza nel tempo del picco come base di riferimento.
- Per scegliere un'ampiezza iniziale adatta per più picchi di interesse, impostare l'ampiezza iniziale su un valore uguale od inferiore al picco più piccolo per ottenere una selettività ottimale.

Se l'ampiezza iniziale scelta è troppo bassa, il rumore può essere interpretato come picco. Se sono presenti sia picchi ampi che picchi ristretti, si possono utilizzare eventi programmati di analisi per adattare l'ampiezza di alcuni dei picchi. Talvolta i picchi diventano significativamente più ampi mentre l'analisi progredisce. Ciò accade ad esempio nelle analisi GC isotermiche e LC isocratiche. Per compensare questa situazione, l'integratore aggiorna automaticamente l'ampiezza del picco man mano che i picchi aumentano l'ampiezza durante l'analisi, se non è stata disabilitata la funzione con un evento programmato.

L'aggiornamento dell'ampiezza del picco viene calcolato come segue:

0.75 x (existing peak width) + 0.25 x (width of current peak)

Height Reject e Peak Width

Il **peak width** e il **height reject** sono valori molto importanti per il processo di integrazione. Modificando questi valori, si possono ottenere risultati molto diversi.

- Aumentare entrambi i valori quando devono essere identificati componenti relativamente dominanti e quantificati in un ambiente con rumore di fondo elevato. L'aumento dell'ampiezza migliora il filtro del rumore, mentre un aumento dello scarto dell'altezza assicura che il rumore di fondo venga ignorato.
- Ridurre i valori per rivelare e quantificare componenti a livello traccia e in particolare di quelli che hanno un'altezza prossima al livello di rumore di fondo. La riduzione dell'ampiezza riduce anche la capacità di filtrare il segnale, mentre la riduzione dello scarto dell'altezza assicura che i picchi più piccoli non vengano esclusi a causa della loro altezza insufficiente.
- Quando un'analisi contiene picchi con ampiezze diverse, l'ampiezza deve essere impostata per i picchi più ristretti e lo scarto dell'altezza ridotto per assicurare che i picchi più ampi non vengano ignorati a causa della loro altezza ridotta.

Calibrazione dell'integrazione

Risulta spesso utile modificare i valori di sensibilità della pendenza, ampiezza del picco, scarto dell'altezza e scarto di area per personalizzare l'integrazione. La figura che segue illustra come questi parametri influenzino l’integrazione di cinque picchi in un segnale.

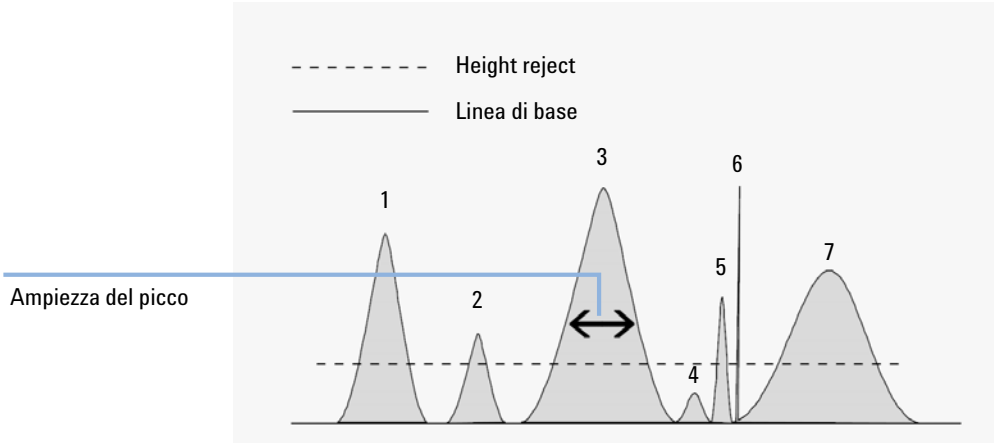

Figura 23 Uso degli eventi iniziali

Un picco viene integrato solo quando tutti e quattro i parametri di integrazione sono soddisfatti. Utilizzando l'ampiezza del picco numero 3, i valori di scarto dell'area e di sensibilità della pendenza, solo i picchi 1, 3, 5 e 7 saranno integrati.

Picco 1 Viene integrato perché tutti e quattro i parametri di integrazione sono soddisfatti.

Picco 2 Viene escluso perché l'area si trova al di sotto del valore di scarto dell'area impostato.

Picco 3 Viene integrato perché tutti e quattro i parametri di integrazione sono soddisfatti.

Picco 4 Non viene integrato perché l'altezza del picco è al di sotto del valore di scarto dell'altezza.

Picco 5 Viene escluso perché l'area si trova al di sotto del valore di scarto dell'area impostato.

Picco 6 Non viene integrato; il filtro e il raggruppamento rendono il picco invisibile.

Picco 7 Viene integrato.

Tabella 6 Valori Scarto dell'altezza e Scarto dell'area

Parametro di integrazione	Picco 1	Picco 2	Picco 3	Picco 4	Picco 5	Picco 7
Scarto dell'altezza	Superiore	Superiore	Superiore	Inferiore	Superiore	Superiore
Scarto dell'area	Superiore	Inferiore	Superiore	Inferiore	Inferiore	Superiore
Picco integrato	Sì	No	Sì	No	No	Sì

Eventi programmati

OpenLAB CDS ChemStation edition offre una serie di eventi programmati che consente di scegliere tra le modalità dell'integratore per la definizione della linea di base dell'algoritmo interno e la definizione dell'utente. Questi eventi programmati possono essere utilizzati per personalizzare la costruzione della linea di base del segnale quando quella predefinita non è adatta. Ad esempio, l'utente può creare un nuovo tipo di evento di somma delle aree che non altera i risultati della AreaSum predefinita. Questi eventi possono essere utili nella somma finale delle aree dei picchi e nella correzione di alterazioni della linea di base a breve e a lungo termine. Per ulteriori informazioni sugli eventi di integrazione, vedere anche la sezione "Eventi iniziali" , pagina 50.

Sommatoria delle aree

Somma delle aree Imposta i punti tra i quali l'integratore somma le aree tra il momento in cui la somma delle aree è attivata e il momento in cui è disattivata.

Porzione di somma delle aree Questo evento è simile a **Area Sum**. Consente di integrare porzioni temporali contigue del cromatogramma senza perdita di intervalli di tempo.

La funzionalità di somma delle aree consente di seguire una linea di base definita dall'utente a lungo termine in modo da integrarla su un cluster di picchi impostando un intervallo. La sommatoria delle aree esegue la somma delle aree sottese ai picchi per questo intervallo. Il sistema definisce il tempo di ritenzione della somma delle aree come punto centrale dell'intervallo di tempo per il quale viene sommata l'area.

Eventi della linea di base

Linea di base corrente Imposta un punto (tempo) nel quale l'integratore reimposta la linea di base sull'altezza corrente del punto di dati, se il segnale è su un picco.

Linea di base ai punti di avvallamento Imposta i punti (On / Off) tra cui l'integratore reimposta la linea di base a ogni valle tra i picchi.

Blocca linea di base Viene tracciata una linea di base orizzontale all'altezza stabilita per la linea di base, a partire dalla quale viene attivato l'evento di blocco della linea di base. L'attivazione permane fino a dove tale evento viene disattivato.

Linea di base a valle successiva Imposta un punto al quale l'integratore reimposta la linea di base alla valle successiva tra i picchi, per poi annullare questa funzione automaticamente.

Per la sommatoria delle aree in cromatogrammi complessi possono essere utilizzati gli eventi seguenti con **Area Sum Slice**. Questi contribuiscono a trovare automaticamente la migliore definizione della linea di base, rendendo superflue le interazioni manuali. Ciò è utile in special modo per l'analisi dei risultati di GC. La linea di base viene calcolata in base a un intervallo di tempo utilizzando stime statistiche.

Imposta linea di base dall'intervallo Definisce l'intervallo utilizzato del cromatogramma per la stima della nuova linea di base. L'intervallo dei punti di dati viene utilizzato per calcolare un punto statisticamente significativo della linea di base a metà dell'intervallo di tempo. Questo algoritmo intelligente ignora i picchi dovuti a disturbi o i picchi imprevisti registrati in questo intervallo attraverso una funzionalità di eliminazione statistica a due passaggi. Ciò assicura risultati più affidabili per la stima della linea di base.

I due eventi **Set Baseline from Range** sono collegati attraverso una linea retta tra i punti centrali. La Figura 24, pagina 56 illustra l'impostazione dell'intervallo della linea di base, mostrata come una zona ombreggiata grigia.

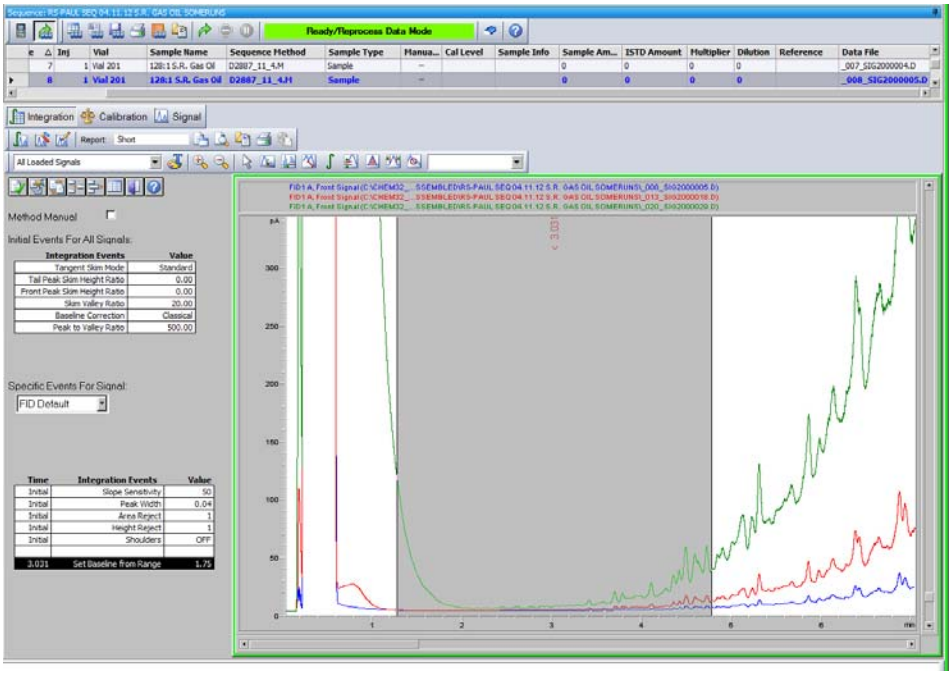

Figura 24 **"Set Baseline from Range"**: l'intervallo della linea di base è indicato da un'ombreggiatura grigia

Imposta linea di base inferiore dall'intervallo

Simile a **Set Baseline from Range**, ma riduce il proprio valore in modo da ridurre al minimo la penetrazione della linea di base. **Set Low Baseline from Range** viene calcolato sottraendo due volte sigma (deviazione standard del rumore) dal valore di y di **Set Baseline from Range**.

Utilizza l inea di base dall'intervallo

Consente di proiettare un valore della linea di base in un momento successivo o precedente. Consente inoltre di costruire curve di linee di base che cambiano la pendenza sotto un cluster di picchi.

Autointegrazione

La funzione **Autointegrate** fornisce un punto di partenza per l'impostazione degli eventi iniziali. Si rivela particolarmente utile quando si implementa un nuovo metodo. Si inizia con la tavola degli eventi di integrazione predefiniti che non contiene eventi programmati a tempo. È possibile ottimizzare i parametri proposti dalla funzione Autointegrazione per uso generale.

Principi di funzionamento

La funzione**Autointegrate** legge i dati del cromatogramma e calcola i valori ottimali per i parametri di integrazione iniziale per ogni segnale del cromatogramma.

L'algoritmo esamina l'1% all'inizio e alla fine del cromatogramma e determina il rumore e la pendenza per questa parte. Il rumore viene determinato come 3 volte la deviazione standard della regressione lineare, diviso per il quadrato del numero percentuale di punti usati nella regressione. Questi valori vengono usati per assegnare valori appropriati allo scarto dell'altezza e alla sensibilità della pendenza per l'integrazione. L'algoritmo assegna quindi un valore temporaneo all'ampiezza del picco, in base alla lunghezza del cromatogramma, usando 0,5% per LC e da 0,3% a 0,2% per GC. Viene effettuata un'integrazione di prova con il valore iniziale di Scarto dell'area impostato su zero. Se necessario, la prova viene ripetuta più volte, regolando i parametri ogni volta, fino a che non vengono rilevati almeno 5 picchi o finché non viene eseguita l'integrazione con uno scarto dell'altezza iniziale di 0. L'integrazione di prova termina se queste condizioni non vengono soddisfatte entro 10 prove.

I risultati dell'integrazione vengono esaminati e l'ampiezza del picco viene regolata sulla base delle ampiezze di picco dei picchi rilevati, tendendo il calcolo verso i picchi iniziali. La simmetria di picco dei picchi rilevati viene utilizzata per includere solo i picchi con simmetria fra 0,8 e 1,3 per il calcolo dell'ampiezza del picco. Se non vengono trovati sufficienti picchi simmetrici, questo limite viene allargato a *minSymmetry/1.5* e *maxSymmetry×1.5*. La linea di base fra i picchi viene quindi esaminata per rifinire i valori precedenti di scarto dell'altezza e di sensibilità della pendenza. Lo scarto di area viene impostato su 90% dell'area minima del picco più simmetrico rilevato durante l'integrazione di prova.

Il cromatogramma viene integrato di nuovo usando questi valori finali per i parametri di integrazione e i risultati dell'integrazione vengono archiviati.

Parametri dell'autointegrazione

Per la funzione di autointegrazione, vengono impostati i seguenti parametri:

- Sensibilità della pendenza iniziale
- Altezza iniziale
- Ampiezza del picco iniziale
- Scarto di area iniziale

Integrazione manuale

Questo tipo di integrazione consente di integrare picchi selezionati o gruppi di picchi. Eccettuato il valore iniziale di scarto dell'area, gli eventi di integrazione impostati vengono ignorati dal software entro l'ambito di integrazione manuale specificato. Tutti i picchi risultanti dall'integrazione manuale al di sotto del limite del parametro di scarto dell'area vengono scartati. Gli eventi di integrazione manuali usano valori di tempo assoluti. Non tengono conto della deriva del segnale.

L'**Manual Integration** permette di definire l'inizio e la fine del picco e di includere quindi le aree ricalcolate nella quantificazione e nella stesura di report. Ognuno di questi punti è evidenziato nei report con il codice di separazione del picco M.

L'integrazione manuale offre le seguenti funzionalità:

Draw Baseline specifica dove devono essere disegnate le linee di base per un picco o un gruppo di picchi. Con la voce di menu **Integration > all valleys** è inoltre possibile specificare se i picchi della scala indicata devono essere separati automaticamente in corrispondenza dei punti di avvallamento.

Negative Peaks specifica quando considerare le aree al di sotto della linea di base come picchi negativi. È inoltre possibile specificare se i picchi della scala indicata devono essere separati automaticamente in corrispondenza dei punti di avvallamento.

Tangent Skim calcola le aree dei picchi eliminati tangenzialmente dal picco principale. L'area del picco tangent-skim viene sottratta dall'area del picco principale.

Split Peak specifica un punto dove dividere un picco con una perpendicolare.

Delete Peak(s) elimina uno o più picchi dai risultati di integrazione.

Codici di separazione del picco per i picchi integrati manualmente

I picchi integrati manualmente sono evidenziati nei rapporti di integrazione con il codice *MM*.

Se c'è un picco prima di quello integrato manualmente e la sua fine cambia a causa dell'integrazione manuale, il codice corrispondente sarà *F* (forzato). Quando vengono rilevati punti di avvallamento, sono impostati con il codice *V*.

Un picco di solvente nel picco principale influenzato dall'integrazione manuale, ad esempio un tangent skim, viene contrassegnato con *R* (solvente ricalcolato).

Salvataggio degli eventi di integrazione manuale

Gli eventi manuali di integrazione, come una linea di base disegnata a mano, sono file di dati e segnali ancora più specifici rispetto agli eventi di integrazione tempificati. In caso di cromatogrammi complessi, è preferibile utilizzare questo tipo di eventi per la rielaborazione. Pertanto, gli eventi manuali di integrazione possono essere memorizzati direttamente nel file dei dati anziché con il metodo.

Ogni volta che il file dei dati viene esaminato o rielaborato, gli eventi manuali di integrazione nel file dei dati vengono applicati automaticamente. Un'analisi contenente eventi manuali di integrazione viene segnalata nella relativa colonna della **Navigation Table**.

Oltre agli strumenti per tracciare una linea di base ed eliminare manualmente un picco, l'interfaccia utente fornisce anche strumenti che consentono di:

- Salvare gli eventi manuali dei cromatogrammi attualmente visualizzati nel file di dati
- Rimuovere tutti gli eventi dai cromatogrammi attualmente visualizzati
- Annullare gli ultimi eventi manuali di integrazione (disponibili fino al salvataggio dell'evento).

Quando si passa al file di dati successivo durante la revisione nella **Navigation Table**, la ChemStation controlla se ci sono eventi manuali di integrazione non salvati e chiede all’utente se desidera salvarli.

Gli eventi manuali memorizzati nel file dei dati durante la revisione nella **Navigation Table** non interferiscono con gli eventi manuali di integrazione memorizzati durante la revisione in modalità **Batch**. Queste due modalità di revisione sono completamente diverse rispetto agli eventi manuali di un file dei dati.

Nelle revisioni di ChemStation precedenti alla B.04.01, gli eventi d'integrazione manuale venivano memorizzati con il metodo anziché nei singoli file di dati. Nella versione B.04.01, è ancora possibile utilizzare questo flusso di lavoro. Il menu **Integration** nella finestra **Data Analysis** fornisce le seguenti opzioni per la gestione degli eventi manuali di integrazione con il metodo:

- **Update Manual Events of Method**: salva i nuovi eventi manuali tracciati nel metodo.
- **Apply Manual Events from Method**: applica gli eventi manuali correntemente salvati nel metodo al file dei dati attualmente caricato.
- **Remove Manual Events from Method**: elimina gli eventi manuali dal metodo.

Per convertire gli eventi manuali memorizzati in un metodo e memorizzarli nel file dei dati, applicare gli eventi dal metodo e memorizzare i risultati nel file dei dati. Se necessario, rimuovere gli eventi dal metodo.

Se la casella di controllo **Manual Events** della **Integration Events Table** è selezionata, gli eventi manuali del metodo vengono sempre applicati quando si carica un file dei dati con questo metodo. Se il file dei dati contiene eventi manuali aggiuntivi, questi vengono applicati dopo gli eventi del metodo. Se la casella di controllo **Manual Events** è selezionata, all'utente non viene mai richiesto di salvare gli eventi nel file dei dati.

Per convertire gli eventi manuali memorizzati in un metodo e memorizzarli nel file dei dati, applicare gli eventi dal metodo e memorizzare i risultati nel file dei dati. Ora è possibile rimuovere gli eventi dal metodo.

Se la casella di controllo **Manual Events** della **Integration Events Table** è selezionata, gli eventi manuali del metodo vengono sempre applicati quando si carica un file dei dati con questo metodo. Se il file dei dati contiene eventi manuali aggiuntivi, questi vengono applicati dopo gli eventi del metodo. Se la casella di controllo **Manual Events** è selezionata, all'utente non viene mai richiesto di salvare gli eventi nel file dei dati.

3 Identificazione dei picchi

Che cos'è l'identificazione dei picchi? 64
Regole di corrispondenza dei picchi 65
Tipi di identificazione dei picchi 66
- Tempo di ritenzione/migrazione assoluto 66
- Tempo di ritenzione relativa 66
- Tempo di ritenzione/migrazione corretto 66
- Qualificatori 67
- Limiti di quantità 67

Tempo di ritenzione/migrazione assoluto 68
Tempi di ritenzione/migrazione corretti 70
- Picchi di riferimento singoli 70
- Picchi di riferimento multipli 71

Qualificatori dei picchi 72
- Correlazione del segnale 73
- Verifica del qualificatore 73
- Calcolo del rapporto del qualificatore 74

Il procedimento di identificazione 75
- Identificazione dei picchi di riferimento 75
- Identificazione dei picchi ISTD 75
- Come trovare i rimanenti picchi calibrati 76
- Classificazione di picchi non identificati 76

Questo capitolo spiega come identificare i picchi.

Che cos'è l'identificazione dei picchi?

L'identificazione dei picchi stabilisce i componenti di un campione incognito basandosi sulle sue caratteristiche cromatografiche/elettroferografiche determinate dall'analisi di un campione di calibrazione ben definito.

L'identificazione di questi componenti è un passo necessario per la quantificazione se il metodo analitico la richiede. Le caratteristiche del segnale di ogni componente di interesse sono contenute nella tavola di calibrazione del metodo.

La funzione del processo di identificazione del picco è quella di paragonare ogni picco del segnale ai componenti della tavola di calibrazione.

La tavola di calibrazione contiene i tempi di ritenzione/migrazione desiderati per i componenti di interesse. Ad ogni picco con un tempo di ritenzione/migrazione corrispondente ad uno contenuto nella tavola di calibrazione, vengono attribuite le caratteristiche di quel composto: ad esempio il nome ed il fattore di risposta. I picchi i cui tempi non corrispondono a quelli contenuti nella tavola di calibrazione sono classificati come sconosciuti. Questo processo è controllato da alcuni fattori:

- il tempo di ritenzione/migrazione nella tavola di calibrazione per i picchi qualificati come picchi di riferimento temporale;
- Le finestre sui tempi di ritenzione/migrazione specificate per i picchi di riferimento.
- I tempi di ritenzione/migrazione nella tavola di calibrazione per i picchi calibrati che non sono di riferimento temporale.
- Le finestre sui tempi di ritenzione/migrazione specificate per questi picchi che non costituiscono riferimento.
- La presenza di altri picchi qualificatori in rapporti corretti.

Regole di corrispondenza dei picchi

Le regole che seguono sono da applicare nel procedimento di corrispondenza dei picchi.

- Se il picco di un campione ha un tempo di ritenzione che rientra nei limiti della finestra di corrispondenza per un componente contenuto nella tavola di calibrazione, gli vengono attribuite le caratteristiche di quest'ultimo.
- Se più di un picco di campione rientra nei limiti della finestra di corrispondenza di un componente, allora il picco più vicino al tempo di ritenzione/migrazione atteso viene identificato come quel componente.
- Se un picco è un riferimento temporale o uno standard interno, allora il picco più grande della finestra viene identificato come quel componente.
- Se si usano qualificatori, allora i loro rapporti sono usati insieme alla finestra di corrispondenza per identificare il componente.
- Se un picco è un qualificatore, il picco misurato che più si avvicina al picco principale del composto viene identificato.
- Se un picco presente nel campione non rientra in nessuna finestra di corrispondenza, viene elencato come componente incognito.

Tipi di identificazione dei picchi

Esistono molte tecniche da utilizzare per la determinazione di corrispondenze fra campioni e picchi contenuti nella tavola di calibrazione del software della ChemStation.

Tempo di ritenzione/migrazione assoluto

Il tempo di ritenzione migrazione del picco di campione viene paragonato al tempo di ritenzione/migrazione atteso, specificato per ogni componente nella tavola di calibrazione.

Tempo di ritenzione relativa

Il sistema calcola il tempo di ritenzione relativa EP e il tempo di ritenzione relativa USP come (Rr = t2/t1) per picchi calibrati e non calibrati.

Tempo di ritenzione/migrazione corretto

I tempi di ritenzione/migrazione attesi per i picchi di componenti, vengono corretti usando i tempi di ritenzione/migrazione reali di uno o più picchi di riferimento ed il processo di corrispondenza viene effettuato usando questi tempi corretti (relativi) di ritenzione/migrazione. Il picco o i picchi di riferimento devono essere specificati nella tavola di calibrazione.

Qualificatori

Oltre all'identificazione dei picchi tramite tempo di ritenzione/migrazione, si possono usare i qualificatori per ottenere un risultato più preciso. Se nella finestra del tempo di ritenzione/migrazione si trovano più picchi allora i qualificatori devono essere usati per identificare il composto corretto.

Limiti di quantità

Le quantità definite nella finestra di dialogo Compound Details (Dettagli composto) vengono usati per qualificare l'identificazione dei picchi. Se la quantità di composto identificato rientra nei limiti, il rapporto conterrà l'identificazione del picco.

Tempo di ritenzione/migrazione assoluto

Nel processo di corrispondenza dei picchi viene usata una finestra per i tempi di ritenzione/migrazione. Questa finestra è centrata sul tempo di ritenzione/migrazione per ciascun picco atteso. Ciascun picco di campione che rientra nella finestra può essere potenzialmente usato per identificare il componente.

La Figura 25, pagina 68 mostra una finestra dei tempi di ritenzione/migrazione per il picco 2 che si trova fra 1,809 e 2,631 minuti, dove il tempo di ritenzione/migrazione atteso è di 2,22 minuti. Per il picco 2 esistono due possibilità: a 1,85 minuti e a 2,33 minuti. Se il picco atteso non è un picco di riferimento, viene scelto il picco più prossimo al tempo di ritenzione/migrazione atteso di 2,22 minuti.

Se il picco atteso è un riferimento temporale o uno standard interno, viene scelto il picco più grande della finestra.

In entrambi i casi la ChemStation sceglie il picco a 2,33 minuti. Se i due picchi sono delle stesse dimensioni, viene scelto il picco più prossimo al centro della finestra.

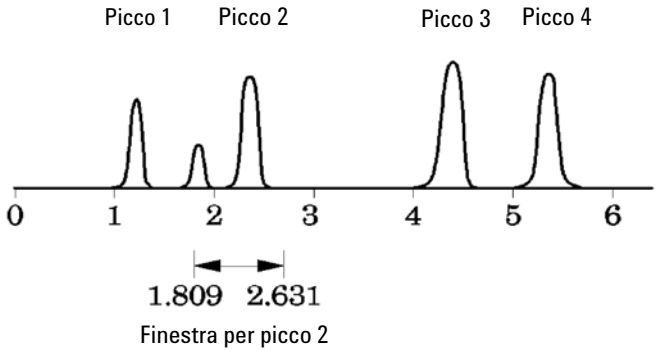

Figura 25 Finestre del tempo di ritenzione/migrazione

I picchi possono essere identificati tramite tre tipi di finestre:

- La finestra dei picchi di riferimento che si applica solo ai picchi di riferimento.

- La finestra dei picchi che non costituiscono riferimento, che si applica a tutti gli altri picchi calibrati.
- Valori specifici per componenti singoli stabiliti nella finestra di dialogo **Compound Details** (Dettagli composto).

I valori predefiniti per queste finestre vengono impostati nella finestra di dialogo Impostazioni di calibrazione. L'ampiezza ad entrambi i lati del tempo di ritenzione/migrazione, che definisce la finestra di corrispondenza del picco, è la somma della finestra assoluta e di quella percentuale.

Una finestra del 5% significa che il picco deve avere un tempo di ritenzione/migrazione compreso tra meno del 2,5% e più del 2,5% rispetto al tempo di ritenzione/migrazione calibrato per il picco. Ad esempio un picco con un tempo di ritenzione/migrazione di 2,00 durante la calibrazione, dovrà essere visualizzato da 1,95 a 2,05 minuti nelle analisi successive.

Ad esempio una finestra assoluta di 0,20 minuti ed una relativa del 10% dà una finestra per il tempo di ritenzione/migrazione compresa fra 1,80 e 2,20 minuti.

1,80 min = 200 min + 0,10 min (0,20 min / 2) + 0,10 min (10% di 2,00 min).

2,20 min = 200 min + 0,10 min (0,20 min / 2) + 0,10 min (10% di 2,00 min).

Tempi di ritenzione/migrazione corretti

La corrispondenza dei picchi con tempi di ritenzione/migrazione assoluti può essere semplice ma non sempre affidabile. I tempi possono variare a causa di piccoli cambiamenti di condizioni o di tecnica. Si possono ottenere picchi fuori dalla finestra di corrispondenza, quindi non identificati.

Una tecnica per controllare le inevitabili fluttuazioni che avvengono nei tempi di ritenzione/migrazione assoluti, consiste nell'esprimere i tempi di ritenzione/migrazione di uno o più picchi di riferimento.

I picchi di riferimento vengono identificati nella tavola di calibrazione come elemento della colonna di riferimento per quel picco. La tecnica di corrispondenza del picco relativo usa il picco o i picchi di riferimento per modificare la collocazione delle finestre di corrispondenza per compensare gli spostamenti dei tempi di ritenzione/migrazione dei picchi campione.

Se nessun picco di riferimento è stato definito nel metodo o la ChemStation non è in grado di identificare almeno un picco di riferimento durante l'analisi il software userà tempi di ritenzione/migrazione assoluti per l'identificazione.

Picchi di riferimento singoli

Si crea una finestra del tempo di ritenzione/migrazione del picco di riferimento intorno al suo tempo di ritenzione/migrazione. Il picco maggiore che rientra in essa è il picco di riferimento. I tempi di ritenzione/migrazione attesi di tutti i picchi della tavola vengono corretti secondo il tempo di ritenzione/migrazione atteso e il tempo reale del picco di riferimento.

Picchi di riferimento multipli

La correzione di tempi di ritenzione/migrazione con un solo picco di riferimento si basa sul presupposto che la deviazione dei tempi di ritenzione/migrazione reali da quelli attesi, cambi in modo uniforme e lineare con il progredire dell'analisi. Spesso durante un'analisi molto lunga i tempi di ritenzione/migrazione cambiano in modo non uniforme. In questi casi si ottengono risultati migliori usando picchi di riferimento multipli distanziati ad intervalli lungo l'analisi. Ciò suddivide il segnale in zone separate. All'interno di ognuna si suppone che la deviazione fra il tempo di ritenzione/migrazione cambi in modo lineare, ma la percentuale di variazione viene determinata in modo separato per ogni zona.

NOTA L'algoritmo di correzione del tempo può non funzionare se i tempi di ritenzione dei picchi di riferimento multipli sono troppo vicini l'uno all'altro e non sono distribuiti per tutto il tempo di analisi.

Qualificatori dei picchi

Un componente può essere identificato tramite più segnali. Sebbene sia applicabile a tutte le forme di cromatografia che usano molti rivelatori o rivelatori capaci di produrre segnali multipli, la rivelazione multisegnale viene usata più comunemente in cromatografia liquida con l'uso di rivelatori a lunghezza d'onda multipla o a serie di diodi. Questi rivelatori sono normalmente impostati in modo che la lunghezza d'onda più prossima all'area di assorbanza maggiore venga usata per definire il picco principale sulla tavola di calibrazione. Nella Figura 26, pagina 72 è $Lambda_1$.

Le altre due lunghezze d'onda acquisite come segnali possono essere usate come qualificatori dei picchi. Nella figura sono $Lambda_2$ e $Lambda_3$.

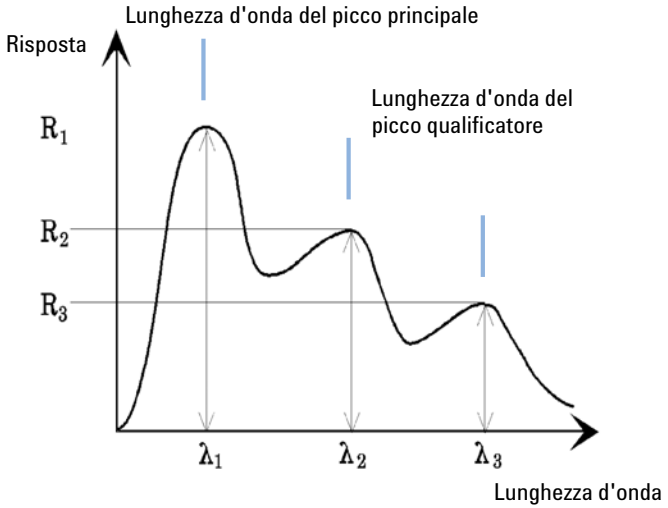

Figura 26 Qualificatori dei picchi

I picchi di un composto hanno un rapporto di risposta costante per le diverse lunghezze d'onda.

La risposta del picco qualificatore è una percentuale della risposta del picco principale. I limiti che determinano l'intervallo accettabile per la risposta attesa possono essere impostati nella tavola di calibrazione quando si seleziona l'opzione Dettagli identificazione. Se il rapporto fra il picco qualificatore principale $Lambda_1$ ed il picco qualificatore, ad esempio $Lambda_3$, si trova fra i limiti consentiti allora l'identità del composto può essere confermata.

Correlazione del segnale

Correlare il segnale significa assegnare due picchi misurati in diversi segnali del rivelatore entro una finestra di tempo definita allo stesso composto. La finestra di correlazione del segnale può essere controllata tramite il parametro **SignalCorrWin** nella tavola **QuantParm** del registro **_DaMethod**. La correlazione del segnale viene disattivata impostando la relativa finestra a 0,0 minuti (per ulteriori informazioni, consultare il manuale *Macro Programming Guide*). Quando la funzione di correlazione del segnale è disabilitata, i picchi che eluiscono con lo stesso tempo di ritenzione/migrazione su segnali diversi del rivelatore, vengono considerati come composti diversi.

La finestra di correlazione del segnale predefinita per dati LC, CE, CE/MS e LC/MS è di 0,03 minuti e 0,0 minuti per dati GC.

Verifica del qualificatore

Se la funzione di correlazione del segnale è abilitata, per impostazione predefinita la verifica del qualificatore è attiva per tutti i tipi di file di dati. Può essere disattivata impostando il segno **UseQualifiers** nella tavola **Quantification Parameters** relativa al metodo. La verifica del qualificatore viene disabilitata quando la correlazione del segnale viene disattivata.

Calcolo del rapporto del qualificatore

Quando si abilita la verifica dei qualificatori per un composto, il rapporto fra le dimensioni del qualificatore e quelle del picco principale viene verificato rispetto ai limiti calibrati. La dimensione può essere l'altezza o l'area a seconda dell'impostazione della base di calcolo specificata in Specifica rapporto.

I picchi qualificatori possono essere calibrati nello stesso modo dei composti target. In altre parole, non è necessario specificare il rapporto qualificatore atteso. Il rapporto del qualificatore atteso viene calcolato automaticamente:

entrambi misurati al tempo di ritenzione del composto.

Il parametro QualTolerance definisce l'intervallo accettabile per il rapporto del qualificatore, ad esempio ±20%.

La tolleranza può essere impostata nell'interfaccia utente della tavola di calibrazione tramite l'opzione Dettagli identificazione ed è una percentuale assoluta.

Per le calibrazioni multilivello la ChemStation calcola una tolleranza minima per il qualificatore basandosi su rapporti del qualificatore misurati per ciascun livello di calibrazione. La tolleranza minima per il qualificatore viene calcolata utilizzando la seguente equazione:

$$\text{minimum qualifier tolerance} = \frac{\sum_{n=1}^{i} (q_i - \bar{q})}{\bar{q} \times i} \times 100$$

Dove q_i è il rapporto del qualificatore misurato al livello i.

Il procedimento di identificazione

Nel tentativo di identificare i picchi, il software effettua tre passaggi attraverso i dati di integrazione.

Identificazione dei picchi di riferimento

Il primo passaggio identifica i picchi di riferimento temporale. Il software ricerca i tempi di ritenzione/migrazione da un'analisi per effettuare corrispondenze all'interno delle finestre di ritenzione/migrazione dei picchi di riferimento della tavola di calibrazione. Un picco dell'analisi viene identificato come picco di riferimento nella tavola di calibrazione se il tempo di ritenzione/migrazione del picco dell'analisi rientra nei limiti della finestra costruita per il picco della tavola di calibrazione.

Se in una finestra si è trovato più di un picco, quello con l'area o l'altezza maggiore seguita dalla corrispondenza di un qualificatore di segnale positivo, se impostato, viene scelto come picco di riferimento.

Dopo ogni volta che si è trovato il picco di riferimento, la differenza fra il suo tempo di ritenzione/migrazione e quello dato dalla tavola di calibrazione viene usato per sistemare i tempi di migrazione/ritenzione attesi per tutti i picchi della tavola .

Identificazione dei picchi ISTD

Il secondo passaggio identifica qualsiasi picco definito come standard interno. Se non sono ancora stati identificati come picchi ISTD, possono essere identificati come picchi di riferimento temporale. I picchi ISTD sono identificati da finestre del tempo di ritenzione/migrazione e picchi qualificatori. Se è stato trovato più di un picco nella stessa finestra ISTD, si sceglie quello maggiore.

Come trovare i rimanenti picchi calibrati

Il terzo passaggio identifica tutti i picchi che rimangono elencati sulla tavola di calibrazione. Per i picchi che non sono riferimenti contenuti nella tavola di calibrazione vengono trovate corrispondenze con i rimanenti picchi dell'analisi usando le proprie finestre RT.

Ogni picco di questo tipo calibrato ha il proprio tempo di ritenzione/migrazione all'interno della tavola. Quest'ultimo viene sistemato durante una particolare analisi basandosi su una preidentificazione dei picchi di riferimento temporale. La finestra del tempo di ritenzione/migrazione del picco calibrato viene regolata basandosi sul tempo di ritenzione/migrazione corretto del picco calibrato.

Se si trova più di un picco nella stessa finestra, viene scelto il picco con il tempo di ritenzione/migrazione più vicino a quello atteso e rispondente alle specifiche del qualificatore opzionale.

Classificazione di picchi non identificati

Se rimangono picchi non identificati, sono classificati come sconosciuti. La ChemStation cerca di raggruppare i picchi sconosciuti che appartengono allo stesso composto. Se un picco è stato rivelato in più segnali, i picchi con lo stesso tempo di ritenzione/migrazione di ogni segnale sono raggruppati sotto lo stesso composto.

I picchi incogniti vengono segnalati solo se è stata effettuata l'apposita selezione nella finestra di dialogo Calibration Settings (Impostazioni di calibrazione).

4
Calibrazione

Curva di calibrazione 78
Calibrazione di gruppo 80
Opzioni di ricalibrazione 81

Questo capitolo descrive i principi di calibrazione del software ChemStation.

Curva di calibrazione

Una curva di calibrazione è la rappresentazione grafica dei dati relativi alla quantità ed alla risposta per un composto ottenuto per uno o più campioni di calibrazione.

Di solito viene iniettata una quota del campione di calibrazione, si ottiene un segnale e viene determinata la risposta calcolando l'area o l'altezza del picco come illustrato dalla Figura 27, pagina 78.

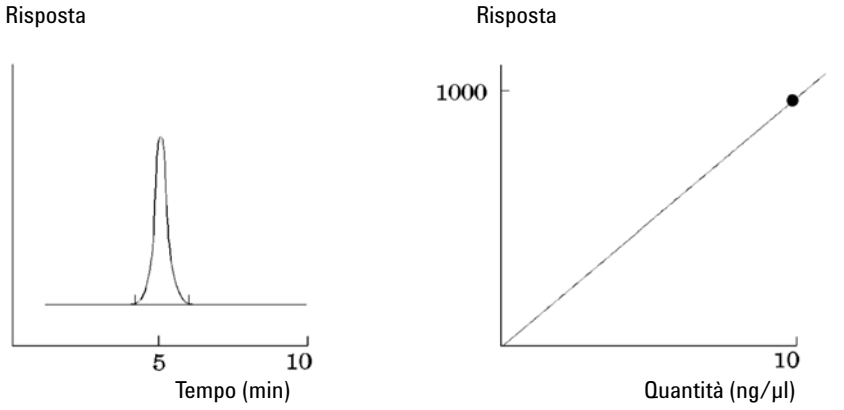

Figura 27 Campione di calibrazione (10ng/µl): segnale e curva di calibrazione

Il *coefficiente di correlazione* viene visualizzato insieme al grafico della curva di calibrazione, che corrisponde alla radice quadrata del coefficiente di regressione e fornisce la misura della correlazione della curva di calibrazione ed i dati misurati. Il valore del coefficiente è espresso con tre cifre decimali, nella scala:

da 0,000 a 1,000

dove:

0,000 = Nessuna correlazione

1,000 = Correlazione perfetta

Per ciascun livello di calibrazione viene visualizzato il *residuo relativo*. Si calcola usando la formula che segue:

$$relRES = \frac{Response_{calibrated} - Response_{calculated}}{Response_{calculated}} \cdot 100$$

dove:

relRES= Residuo relativo in percentuale

La risposta calcolata rappresenta il punto sulla curva di calibrazione.

La *deviazione standard del residuo*, che viene stampata su alcuni rapporti e viene calcolata utilizzando la formula che segue quando si seleziona Stampa tavola calibrazione e curve:

$$ResSTD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (Resp_{calibratedi} - Resp_{calculatedi})^2}{n-2}}$$

dove:

ResSTD = Deviazione standard del residuo

$Resp_{calibratedi}$= Risposta calibrata per punto i

$Resp_{calculatedi}$ = Risposta calcolata per punto i

N= Numero di punti di calibrazione

Calibrazione di gruppo

La calibrazione di gruppo può essere applicata a composti le cui concentrazioni individuali non sono note mentre la somma delle concentrazioni del gruppo è nota. Un esempio 1 costituito dagli isomeri. Vengono calibrati composti completi. Si usano le formule che seguono:

Calibrazione

$$Conc_{AB} = RF_A \cdot Response_A + RF_B \cdot Response_B$$

Dove:

ConcAB è la concentrazione del gruppo di composti comprendente il composto A e B

$Response_A$ è l'area (o l'altezza) del composto A

RF_A è il fattore di risposta

Per i composti all'interno di un gruppo supponiamo fattori di risposta uguali:

$$RF_A = RF_B$$

Quindi la concentrazione di un composto entro un gruppo viene calcolata come segue:

$$Conc_A = \frac{Conc_{AB} \cdot Resp_A}{Resp_A + Resp_B}$$

Opzioni di ricalibrazione

Esistono diversi modi di aggiornare le risposte nella tavola di calibrazione con i nuovi dati a disposizione.

Average

La media di tutte le calibrazioni viene calcolata utilizzando la seguente formula

$$Response = \frac{n \cdot Response + MeasResponse}{n+1}$$

Floating Average

Viene calcolata una media pesata di tutte le calibrazioni. Il peso aggiornato viene impostato nella finestra di dialogo **Recalibration Settings**.

$$Response = \left(1 - \frac{Weight}{100}\right) \cdot Response + \left(\frac{Weight}{100}\right) \cdot MeasResponse$$

Replace

I nuovi valori di risposta sostituiscono i vecchi.

5 Quantificazione

Che cos'è la quantificazione? 84
Calcoli di quantificazione 85
Fattori di correzione 86
- Fattore di risposta assoluto 86
- Moltiplicatore 86
- Fattore di diluizione 86
- Quantità di campione 87

Procedimenti di calcolo non calibrati 88
- Area % e altezza % 88

Procedimenti di calcolo calibrati 89
Calcolo dello standard esterno 90
Calcolo con il procedimento della normalizzazione % 93
Calcolo con il procedimento dello standard interno 94
- Fase 1: Calibrazione 95
- Fase 2: Campione incognito 96
- Calcolo ISTD di picchi calibrati 96
- Calcolo ISTD di picchi non calibrati 97

Questo capitolo descrive le modalità con cui la ChemStation effettua operazioni di quantificazione. In particolare, fornisce informazioni sui calcoli di area % e altezza %, standard esterno (ESTD), normalizzazione %, standard interno (ISTD) e sulla quantificazione di picchi non identificati.

Che cos'è la quantificazione?

Dopo che i picchi sono stati integrati e identificati, il passo successivo dell'analisi è la quantificazione. La quantificazione utilizza l'area o l'altezza del picco per determinare la concentrazione di un composto in un campione.

Un'analisi quantitativa comporta effettuare varie operazioni che sono brevemente descritte di seguito:

- Identificare il composto che si sta analizzando.
- Definire un metodo per analizzare campioni che contengono il composto.
- Analizzare uno o più campioni che contengono concentrazioni note del composto, per ottenere la risposta dovuta a tali concentrazioni.

  In alternativa, è possibile analizzare un certo numero di questi campioni con concentrazioni diverse del composto di interesse, se il rivelatore a disposizione ha un tipo di risposta non lineare. Questo procedimento è chiamato *calibrazione multilivello*.
- Analizzare il campione contenente una concentrazione nota del composto, per ottenere la risposta dovuta a tale concentrazione.
- Confrontare la risposta dovuta alla concentrazione incognita con quella dovuta alla concentrazione nota, per determinare in quale quantità è presente il composto.

Per poter confrontare validamente la risposta del campione incognito con quella del campione noto, i dati devono essere acquisiti ed elaborati in condizioni identiche.

Calcoli di quantificazione

Per determinare la concentrazione di ogni componente presente nella miscela, la ChemStation offre i seguenti procedimenti di calcolo

- Percentuale
- Normalizzazione
- Standard esterno (ESTD)
- ESTD%
- Standard interno (ISTD)
- ISTD%

I calcoli utilizzati per determinare la concentrazione di un composto in un campione incognito dipendono dal tipo di quantificazione. Ogni procedimento di calcolo utilizza l'area o l'altezza del picco e produce un tipo diverso di rapporto.

Fattori di correzione

I calcoli di quantificazione utilizzano quattro fattori di correzione, *fattore di risposta assoluto*, *moltiplicatore*, *fattore di diluizione* e *quantità di campione*. Questi fattori vengono usati nelle procedure di calibrazione per compensare le variazioni di risposta del rivelatore ai diversi componenti del campione e per differenti concentrazioni, diluizioni e quantità del campione, unità di conversione.

Fattore di risposta assoluto

Il fattore di risposta assoluto per un componente in un campione corrisponde alla quantità del componente divisa per l'area o l'altezza misurate del picco di tale componente nell'analisi di una miscela di calibrazione. Il fattore di risposta assoluto, usato per ogni procedura di calcolo calibrata, corregge la risposta del rivelatore ai componenti individuali del campione.

Moltiplicatore

Il moltiplicatore viene usato in ogni formula di calcolo per moltiplicare il risultato per ogni componente. Il moltiplicatore può essere usato per convertire le unità utilizzate per esprimere le quantità.

Fattore di diluizione

Il fattore di diluizione è un numero per il quale vengono moltiplicati tutti i risultati calcolati prima della stampa del rapporto. Si può usare il fattore di diluizione per modificare la scala dei risultati o correggere in caso di modifiche nella composizione del campione durante la preparazione che precede l'analisi. Il fattore di diluizione può anche essere usato per altri scopi che richiedano l'uso di un fattore costante.

Quantità di campione

Se si scelgono i calcoli ESTD% o ISTD%, i rapporti ESTD e ISTD danno valori relativi invece che assoluti: la quantità di ogni composto viene espressa come percentuale della quantità di campione. La quantità di campione viene usata nei rapporti ESTD% e ISTD% per convertire la quantità assoluta dei componenti analizzati in valori relativi, dividendo per il valore specificato.

Procedimenti di calcolo non calibrati

I procedimenti di calcolo non calibrati non richiedono tavola di calibrazione.

Area % e altezza %

Il procedimento di calcolo dell'**Area%** riporta l'area di ogni picco dell'analisi come percentuale dell'area totale di tutti i picchi dell'analisi. **Area%** non richiede calibrazione preventiva e non dipende dalla quantità di campione iniettata entro i limiti del rivelatore. Non vengono usati fattori di risposta. Se tutti i componenti rispondono allo stesso modo nel rivelatore e sono eluiti, **Area%** costituisce una buona approssimazione delle quantità relative di componenti.

Area% è usata normalmente dove i risultati qualitativi sono motivo di interesse e per produrre informazioni per creare la tavola di calibrazione richiesta per altri procedimenti di calibrazione.

La procedura di calcolo dell'**Height%** riporta l'altezza di ogni picco dell'analisi come percentuale dell'altezza totale di tutti i picchi dell'analisi.

Il moltiplicatore e il fattore di diluizione di **Calibration Settings**, della finestra di dialogo **Sample Information** o di **Sequence Table** non sono applicati nel calcolo di Area% o Altezza%.

Procedimenti di calcolo calibrati

I procedimenti di calcolo dello standard esterno (ESTD), della normalizzazione e dello standard interno (ISTD) richiedono fattori di risposta e quindi prevedono l'utilizzo di una tavola di calibrazione. La tavola di calibrazione specifica la conversione delle risposte in unità scelte dall'utente unitamente alla procedura.

Calcolo dello standard esterno

La procedura ESTD è un procedimento di quantificazione di base nel quale i campioni di calibrazione e incogniti vengono analizzati nelle stesse condizioni. I risultati ottenuti con un campione incognito vengono successivamente confrontati con quelli del campione di calibrazione, per calcolare la quantità nel campione incognito.

Il procedimento ESTD, a differenza del procedimento ISTD, usa fattori di risposta assoluti. I fattori di risposta sono ottenuti da una calibrazione e quindi archiviati. Nelle analisi che seguono, le quantità dei componenti vengono calcolate applicando tali fattori di risposta alle quantità di campione misurate. Tuttavia, è importante verificare che la quantità di campione iniettata sia riproducibile in tutte le analisi, poiché nel campione non è presente uno standard per la correzione delle variazioni dovute alla quantità di campione iniettato o alla preparazione del campione.

Quando si prepara un rapporto ESTD, il calcolo della quantità di un particolare composto in un campione incognito avviene in due fasi:

1. Si calcola un'equazione per la curva attraverso i punti di calibrazione per il composto, utilizzando il tipo di adattamento della curva specificato nella finestra di dialogo Impostazioni di calibrazione o Curva di calibrazione.
2. La quantità di composto nel campione incognito viene calcolata usando l'equazione descritta in seguito. La quantità può essere riportata nel rapporto o può essere usata per ulteriori calcoli richiesti per stabilire il moltiplicatore, il fattore di diluizione o la quantità di campione, prima di essere resi in forma di rapporto.

Se si sceglie il rapporto ESTD, l'equazione da usare per calcolare la quantità assoluta del componente x, è la seguente:

$$\text{Absolute Amt of x} = Response_x \cdot RF_x \cdot M \cdot D$$

dove:

$Response_x$ è la risposta del picco x;

RF_x è il fattore di risposta per il componente x, calcolato:

$$\mathrm{RF}_x = \frac{\mathrm{Amount}_x}{\mathrm{Response}_x}$$

M è il moltiplicatore

D è il fattore di diluizione.

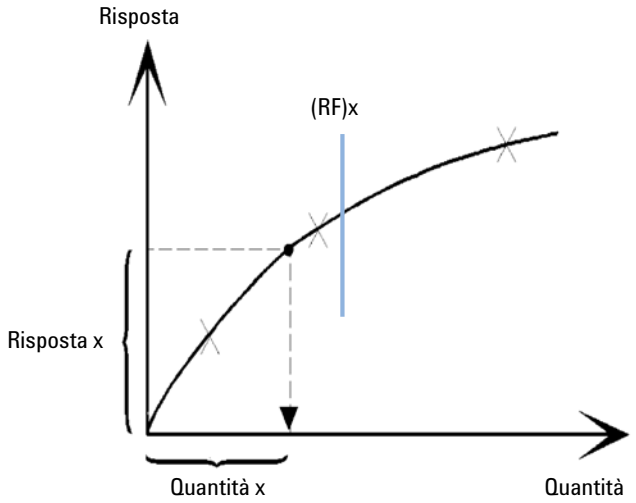

Figura 28 Fattore di risposta

Il moltiplicatore e il fattore di diluizione sono leggibili sia dalla finestra di dialogo **Calibration Settings** sia da **Sample Information**.

Se viene scelto il rapporto ESTD% e la quantità del campione non è zero, la quantità relativa (%) di un composto x viene calcolata come segue:

$$\text{Relative Amt of x} = \frac{\{\text{Absolute Amt of x}\} \cdot 100}{\text{Sample Amount}}$$

dove:

La quantità assoluta di x (absolute Amt) viene calcolata come sopra;

La *quantità di campione* si ottiene dalla finestra di dialogo Informazioni sul campione o Impostazioni di calibrazione per analisi singole. Se la quantità di campione è zero, si calcola l'ESTD.

Calcolo con il procedimento della normalizzazione %

Nel metodo della normalizzazione percentuale (Norm%), alle aree o alle altezze dei picchi vengono applicati i fattori di risposta, per compensare eventuali variazioni della sensibilità del rivelatore nei confronti dei diversi componenti del campione.

Il report Norm% viene calcolato allo stesso modo di un report ESTD, a eccezione del fatto che è necessario un ulteriore passaggio per calcolare le quantità di composto relative invece che assolute.

Il report di normalizzazione percentuale (Norm%) ha lo stesso svantaggio di quelli di area e altezza percentuale. Qualsiasi modifica che interessi l'area totale del picco interesserà anche il calcolo della concentrazione di ogni singolo picco. Il report di normalizzazione può essere usato solo se tutti i componenti eluiscono e possono essere integrati. L'esclusione di alcuni picchi da un report di normalizzazione comporta la necessità di modificare i risultati relativi al campione.

L'equazione utilizzata per calcolare la **Norm%** di un componente x è:

$$\text{Norm\% of x} = \frac{\text{Response}_x \cdot \text{RF}_x \cdot 100 \cdot M \cdot D}{\sum\{\text{Response} \cdot RF\}}$$

dove:

$Risposta_x$	è l'area o l'altezza del picco x
RF_x	è il fattore di risposta
$\Sigma(Risposta \cdot RF)$	è il totale di tutti i prodotti *(Risposta · RF)* per tutti i picchi compreso il picco x
M	è il moltiplicatore
D	è il fattore di diluizione

Il moltiplicatore e il fattore di diluizione possono essere visualizzati nelle finestre di dialogo **Quantitation Settings** e **Specify Report** o nella tabella di sequenza.

Calcolo con il procedimento dello standard interno

Il procedimento ISTD elimina gli svantaggi del metodo ESTD grazie all'aggiunta di un componente in quantità nota, che serve da fattore di normalizzazione. Questo componente, detto *standard interno*, viene aggiunto sia ai campioni di calibrazione sia a quelli incogniti.

Il software prende i fattori di risposta adeguati ottenuti da una calibrazione precedentemente archiviata in un metodo. Usando la concentrazione dello standard interno e le aree o le altezze dei picchi prese dall'analisi, il software calcola le concentrazioni dei componenti.

Il composto usato come standard interno dovrebbe essere simile al composto calibrato, sia chimicamente, sia per quanto riguarda il tempo di ritenzione/migrazione, ma deve essere distinguibile cromatograficamente.

Tabella 7 Procedura ISTD

Vantaggi	Svantaggi
La variazione delle del volume iniettato non è significativa.	È necessario aggiungere lo standard interno a ogni campione.
La deviazione dello strumento è compensata dallo standard interno.	
Gli effetti della preparazione del campione sono ridotti al minimo se il comportamento chimico dell'ISTD e quello del campione incognito sono simili.	

Se la procedura ISTD viene usata per calibrazioni con caratteristiche non lineari, occorre prestare attenzione affinché errori del principio di calcolo non provochino errori sistematici. Nelle calibrazioni multilivello, la quantità di composto usato come ISTD deve essere tenuta costante, cioè la stessa per tutti i livelli se la curva di calibrazione del composto non è lineare.

Nell'analisi con lo standard interno, la quantità del componente che interessa è correlata alla quantità di componente standard interno dal rapporto delle risposte dei due picchi.

In una calibrazione ISTD in due fasi, il calcolo del rapporto di quantità corretto di un composto particolare in un campione sconosciuto avviene nelle fasi che seguono.

Fase 1: Calibrazione

1 I punti di calibrazione vengono costruiti calcolando il rapporto di quantità e quello di risposta per ciascun livello di un particolare picco della tavola di calibrazione.

   Il rapporto di quantità è uguale all'area del composto divisa per l'area o l'altezza dello standard interno a questo livello.

   Il rapporto di risposta è uguale all'area del composto divisa per l'area o l'altezza dello standard interno a questo livello.

2 Si calcola un'equazione per la curva passante per i punti di calibrazione utilizzando il tipo di curva stabilito nella finestra di dialogo Impostazioni di calibrazione o Curva di calibrazione.

$$RF_x = \frac{\text{Amount Ratio}}{\text{Response Ratio}}$$

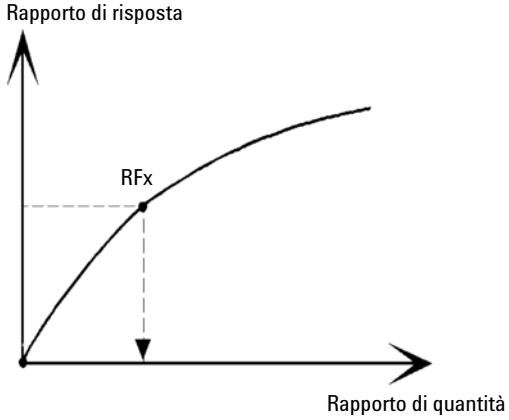

Figura 29 Rapporto di quantità

Fase 2: Campione incognito

1. La risposta del composto nel campione incognito viene divisa per la risposta dello standard interno nel campione incognito per trovare un rapporto di risposta per il campione stesso.
2. Il rapporto di quantità viene calcolato usando l'equazione della curva determinata al punto due della fase precedente e la quantità reale di ISTD nel campione.

Calcolo ISTD di picchi calibrati

Le equazioni usate per calcolare la quantità effettiva di un componente calibrato x per una calibrazione a livello singolo sono:

$$\text{Response Ratio} = \frac{\text{Response}_x}{\text{Response}_{\text{ISTD}}}$$

$$\text{Actual Amount of x} = \text{RF}_x \cdot \{\text{Response Ratio}\}_x \cdot \text{Actual Amount of ISTD} \cdot M \cdot D$$

Dove:

RF_x è il fattore di risposta del composto x

La *quantità effettiva* di ISTD è il valore inserito nella finestra di dialogo Impostazioni calibrazione o Informazioni campione per lo standard interno aggiunto al campione incognito

M è il moltiplicatore

D è il fattore di diluizione

Se si sceglie il tipo di report ISTD%, si usa l'equazione seguente per calcolare la quantità relativa (%) del componente x:

$$\text{Relative Amt of x} = \frac{\{\text{Absolute Amt of x}\} \cdot 100}{\text{Sample Amount}}$$

Calcolo ISTD di picchi non calibrati

Sono disponibili due modi per definire il fattore di risposta usato per calcolare la quantità dei picchi non identificati.

1 Usare il fattore di risposta fisso impostato nella casella **With Rsp Factor** della finestra di dialogo **Calibration Settings**. È possibile scegliere di correggere il fattore di risposta fisso precisando una correzione dell'ISTD.

$$\text{Actual Amount of x} = \text{RF}_x \cdot \{\text{Response Ratio}\}_x \cdot \text{Actual Amount of ISTD} \cdot M \cdot D$$

$$\text{Response Ratio} = \frac{\text{Response}_x}{\text{Response}_{\text{ISTD}}}$$

RF_x è il fattore di risposta stabilito nella finestra di dialogo **Calibration Settings**.

Da queste formule si può notare che le variazioni di risposta dell'ISTD vengono usate per correggere la quantificazione del componente incognito.

2 Utilizzare un picco calibrato. Ciò assicura che lo stesso fattore di risposta venga usato per la quantificazione di tutti i picchi. Il fattore di risposta del composto scelto e dei picchi non calibrati viene corretto durante tutte le ricalibrazioni. Se il fattore di risposta del picco calibrato cambia, il fattore di risposta dei picchi non identificati cambia della stessa quantità. Se la tavola di calibrazione è già impostata, è possibile scegliere un composto dalla casella **Using Compound** della finestra di dialogo **Calibration Settings**.

Le equazioni usate per calcolare la quantità effettiva di un picco non calibrato x sono illustrate in precedenza.

6
Valutazione dell'idoneità del sistema

Valutazione della system suitability 101

Determinazione del rumore di fondo 104

- Calcolo di un rumore pari a sei volte la deviazione standard 105
- Calcolo del rumore tramite la formula picco-picco 105
- Determinazione del rumore secondo il metodo ASTM 107
- Calcolo del rapporto segnale-rumore 109
- Deriva e oscillazione 111

Calcolo della simmetria del picco 113

Formule e calcoli di idoneità del sistema 115

Definizioni generali 116

- Volume vuoto 116
- Tempo di ritenzione di un composto non ritenuto t (m) [min] 116

Definizioni di test sulle prestazioni 117

- Momenti statistici 117
- Momenti statistici, disallineamento ed eccesso 118
- Ampiezza reale del picco Wx [min] 119
- Fattore di capacità (USP), Rapporto di capacità (ASTM) k' 119
- Fattore di scodamento t (USP) 120
- Numero di piatti teorici n per colonna (USP, ASTM) 121
- Numero di piatti teorici al metro N [1/m] 122
- Definizioni di test sulle prestazioni 117
- Risoluzione R (USP, ASTM) 123
- Risoluzione Rs (EP/JP) 124
- Risoluzione (definizioni classiche della ChemStation) 124

Definizioni per la riproducibilità 126
Media campione M 126
Deviazione standard S del campione 126
Deviazione standard relativa RSD[%] (USP) 127
Deviazione standard della media SM 127
Intervallo di confidenza CI 128
Analisi della regressione 129
Coefficiente di regressione 130
Deviazione standard (S) 130
Accesso ai numeri a doppia precisione memorizzati internamente 131

Questo capitolo descrive ciò che può fare la ChemStation per valutare le prestazioni sia dello strumento analitico prima che venga utilizzato per l'analisi del campione e del metodo analitico prima che sia utilizzato normalmente sia per controllare le prestazioni dei sistemi di analisi prima e durante le analisi di routine.

Le prestazioni dei picchi possono essere calcolate sia per ogni picco integrato dai dati caricati sia per picchi nuovi integrati manualmente. L'apposito strumento interattivo calcola le caratteristiche dei picchi e le visualizza sull'interfaccia utente.

Valutazione della system suitability

Secondo le buone prassi di laboratorio, è opportuno sia valutare le prestazioni di uno strumento analitico prima che venga utilizzato per l'analisi dei campioni sia il metodo analitico prima che venga usato per le analisi di routine. Inoltre, è opportuno anche controllare le prestazioni dei sistemi di analisi prima, durante e dopo le analisi di routine. Il software ChemStation fornisce strumenti idonei per effettuare questi tre tipi di test automaticamente. I test sulla strumentazione possono includere la misurazione della sensibilità dello strumento, della precisione dei tempi di ritenzione/migrazione dei picchi e della precisione delle aree dei picchi. Un metodo di prova può includere la misurazione dei tempi di ritenzione/migrazione dei picchi e delle relative quantità, della selettività e della robustezza del metodo rispetto alle variazioni che si verificano giornalmente durante l'uso. I test sui sistemi possono comprendere la misurazione della precisione delle quantità, della risoluzione tra due picchi specifici e lo scodamento dei picchi.

I laboratori che hanno l'obbligo di conformarsi con:

- Buona Prassi di Laboratorio (Good Laboratory Practice - GLP);
- Buona Prassi di Produzione (Good Manufacturing Practice regulations - GMP e Current Good Manufacturing Practice regulations - cGMP);
- Buona Prassi di Laboratorio automatizzata (Good Automated Laboratory Practice - GALP);

sono tenuti a eseguire questi test e a documentare dettagliatamente i risultati. Il laboratori che hanno aderito a sistemi di controllo della qualità, come la certificazione ISO9000, devono poter certificare le prestazioni di tutti gli strumenti utilizzati.

ChemStation consente di raggruppare i risultati di varie analisi e di creare un report di riepilogo che contenga una valutazione statistica di tali risultati.

I test vengono generalmente documentati in un formato approvato dagli enti normativi e dalle società di certificazione esterne. Le statistiche includono informazioni su:

- Tempo di ritenzione/migrazione dei picchi
- Area dei picchi
- Quantità

- Altezza dei picchi
- Larghezza dei picchi a metà altezza
- Simmetria dei picchi
- Scodamento dei picchi
- Fattore di capacità (k´)
- Numero di piastre
- Risoluzione tra i picchi
- Selettività rispetto al picco precedente
- Scostamento
- Eccessi

Vengono calcolati anche il valore medio, la deviazione standard, la deviazione standard relativa e l'intervallo di confidenza. Gli utenti possono impostare limiti per la deviazione standard, la deviazione standard relativa o l'intervallo di confidenza per ciascuno dei parametri. Se i valori superano i limiti, i valori anomali vengono evidenziati nel report per richiamare l'attenzione dell'operatore.

La qualità dei dati analitici è ulteriormente supportata dalla possibilità di registrare le condizioni effettive presenti al momento delle misurazioni. Il registro della ChemStation contiene informazioni sulle condizioni pre- e post- analisi di ciascun strumento Queste informazioni vengono salvate insieme ai dati e inclusi nei report insieme ai dati dei campioni. Le curve delle prestazioni degli strumenti vengono registrate, durante tutta l'analisi, come segnali e salvati nel file dati. Se lo strumento lo consente, è possibile richiamare queste registrazioni durante gli audit e sovrapporli sui cromatogrammi.

Il programma consente anche di misurare automaticamente il rumore della linea di base e la deriva. Utilizzando i dati dell'altezza dei picchi per ciascun composto calibrato presente nel metodo, è possibile anche calcolare un livello minimo di rilevazione.

Infine, è possibile anche includere in ciascun report stampato informazioni sulla configurazione degli strumenti, i numeri di serie degli strumenti, i dati identificativi sulle colonne/capillari e commenti personali.

I risultati estesi sulle prestazioni vengono calcolati solo per i composti calibrati nel metodo e caratterizzati utilizzando i tempi di ritenzione/migrazione e i nomi dei composti.

Un rapporto di test tipico sulle prestazioni di un sistema contiene generalmente i seguenti risultati sulle prestazioni:

- Dettagli sullo strumento
- Dettagli sulle colonne/i capillari
- Metodo analitico
- Informazioni sul campione
- Informazioni sull'acquisizione
- Descrizione del segnale e determinazione del rumore della linea di base
- Segnale etichettato con i tempi di ritenzione/migrazione o i nomi dei composti

Inoltre, per ciascun composto calibrato contenuto nel cromatogramma vengono generate le seguenti informazioni:

- Tempo di ritenzione/migrazione
- k´
- Simmetria
- Ampiezza dei picchi
- Numero di piastre
- Risoluzione
- Rapporto segnale-rumore and
- Nome del composto

Determinazione del rumore di fondo

Il rumore può essere determinato a partire dal valore dei punti di dati di una scala temporale di segnale scelta. Il rumore di fondo può essere trattato in tre modi:

- Come sei volte la deviazione standard (sd) della regressione lineare di deriva.
- Come picco-picco (deriva corretta).
- Come stabilito dal metodo ASTM (ASTM E685-93).

Il rumore può essere calcolato per un massimo di sette intervalli del segnale; gli intervalli devono essere specificati come parte delle impostazioni di idoneità del sistema nei parametri per la stesura dei rapporti.

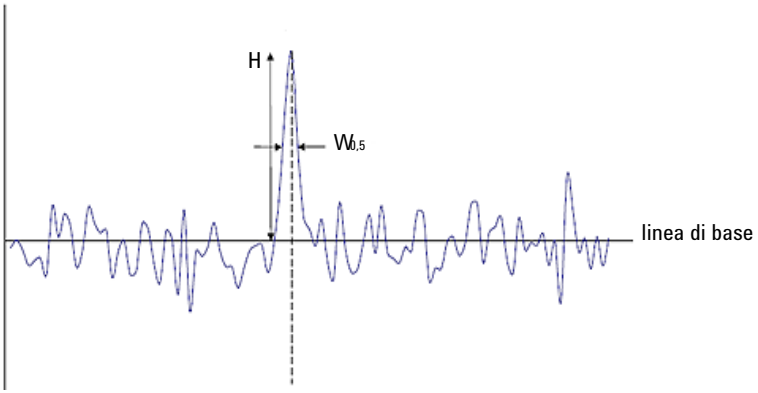

Figura 30 Cromatogramma con segnale di picco e rumore

H	Altezza del picco dal valore massimo alla linea di base (migliore linea retta attraverso il rumore)
$W_{0,5}$	Larghezza dei picchi a metà altezza

Calcolo di un rumore pari a sei volte la deviazione standard

La regressione lineare viene calcolata utilizzando tutti i punti di dati compresi in un intervallo di tempo dato (vedere la sezione “Analisi della regressione” , pagina 129). Il rumore è dato dalla seguente formula:

$N = 6 \times Std$

dove

N è il rumore basato sul metodo di sei volte la deviazione standard e

Std è la deviazione standard della regressione lineare di tutti i punti di dati nell'intervallo di tempo selezionato.

Calcolo del rumore tramite la formula picco-picco

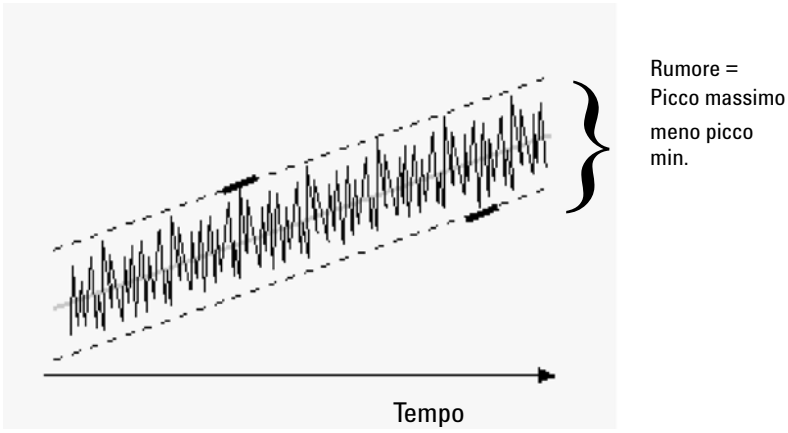

Figura 31 Rumore dal picco massimo al picco minimo (Distanza)

La deriva viene innanzitutto calcolata determinando la regressione lineare utilizzando tutti i punti di dati compresi nell'intervallo di tempo (vedere la sezione “Analisi della regressione” , pagina 129). La regressione lineare viene sottratta da tutti i punti di dati compresi nell'intervallo di tempo per fornire un segnale corretto della deriva.

Il rumore da picco a picco viene quindi calcolato utilizzando la formula:

$N = I_{max} - I_{min}$

dove

N è il rumore picco-picco,

I_x sono i punti di dati calcolati utilizzando la formula LSQ, con

I_{max} come picco con l'intensità più elevata (massimo) e

I_{min} come picco di intensità inferiore (minimo) per l'intervallo di tempo specificato.

Secondo i calcoli della Farmacopea Europea il rumore picco-picco viene calcolato utilizzando un segnale di riferimento del bianco nell'intervallo di -10/+10 volte $W_{0,5}$ che accompagna ciascun picco. Questa regione può essere simmetrica al segnale di interesse oppure, se necessario a causa di segnali di matrice, asimmetrica.

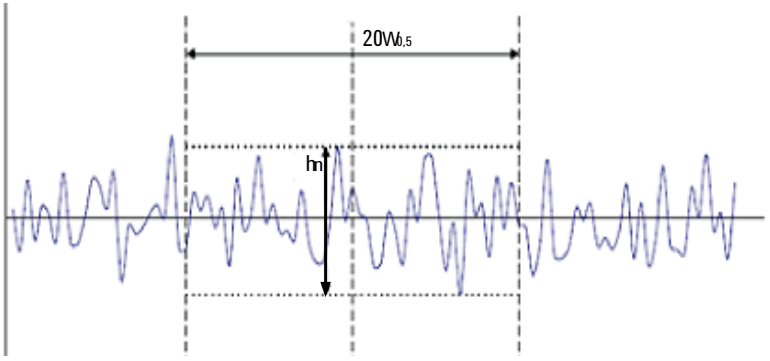

Figura 32 Determinazione del rumore dal cromatogramma di un bianco

Dove:

La regione 20 $W_{0,5}$ corrisponde a 20 volte $W_{0,5}$.

h_n è l'ampiezza massima del rumore della linea di base nella regione 20 volte $W_{0,5}$.

Determinazione del rumore secondo il metodo ASTM

La determinazione del rumore ASTM (ASTM E 685-93) si basa sulle pratiche standard per la verifica di rivelatori fotometrici a lunghezza d'onda variabile utilizzati in cromatografia liquida, come definito dalla Società Americana per la verifica ed i materiali (American Society for Testing and Materials). Basandosi sulle dimensioni dell'intervallo di tempo si possono distinguere tre diversi tipi di rumore. La determinazione del rumore si basa su una misurazione da picco a picco entro un intervallo di tempo definito.

Tempo del ciclo, t

Rumore a lungo termine, l'ampiezza massima per tutte le variazioni casuali del segnale di frequenza del rivelatore va da 6 a 60 cicli all'ora. Il rumore a lungo termine si determina quando la scala scelta supera l'ora. La scala temporale per ciascun ciclo (dt) viene impostata su dieci minuti e sarà pari a circa sei cicli all'interno della scala temporale scelta.

Rumore a breve termine, l'ampiezza massima per tutte le variazioni casuali del segnale del rivelatore di una frequenza superiore ad un ciclo al minuto. Il rumore a breve termine si determina per una scala temporale scelta fra i 10 ed i 60 minuti. La scala temporale per ogni ciclo (dt) viene impostata su 1 minuto e sarà pari ad almeno 10 cicli nell'intervallo di tempo scelto.

Rumore a brevissimo termine (non facente parte di ASTM E 685-93), questo termine è stato introdotto per descrivere l'ampiezza massima per tutte le variazioni casuali del segnale del rivelatore di una frequenza superiore ad un ciclo ogni 0,1 minuti.

Il rumore a brevissimo termine si determina per un intervallo di tempo selezionato da 1 a 10 minuti. La scala temporale per ogni ciclo (dt) viene impostata su 0,1 minuti e sarà pari ad almeno 10 cicli nell'intervallo di tempo scelto.

Determinazione del numero dei cicli, n

$$n = \frac{t_{tot}}{t}$$

Dove t è il tempo del ciclo e t_{tot} è il tempo totale per il quale il rumore viene calcolato.

Calcolo del rumore da picco a picco per ciascun ciclo

La regressione lineare viene calcolata utilizzando tutti i punti di dati compresi nell'intervallo di tempo (consultare la sezione “Analisi della regressione” , pagina 129). La regressione lineare viene sottratta da tutti i punti di dati compresi nell'intervallo di tempo per fornire un segnale corretto della deriva. Il rumore da picco a picco viene quindi calcolato utilizzando la formula:

$N = I_{max} - I_{min}$

Dove N è il rumore da picco a picco, I_{max} è il picco con l'intensità più elevata (massimo) e I_{min} è il picco di intensità inferiore (minimo) per l'intervallo di tempo specificato.

Calcolo del rumore secondo ASTM

$$N_{ASTM} = \frac{\sum_{i=1}^{n} N}{n}$$

Dove N_{ASTM} è il rumore secondo il metodo ASTM.

La determinazione del rumore secondo ASTM non viene effettuata se l'intervallo di tempo scelto è inferiore a un minuto. Se la scala temporale scelta è maggiore od uguale a un minuto, il rumore può essere determinato secondo i metodi ASTM precedentemente descritti, a seconda della scala. Per il calcolo vengono usati almeno sette punti di dati per ciclo. Nella determinazione del rumore automatizzata i cicli sono sovrapposti per il 10%.

Calcolo del rapporto segnale-rumore

La ChemStation presenta due opzioni per il calcolo del rapporto segnale-rumore:

- Attraverso sei volte la deviazione standard (sd) della regressione lineare della deriva per il calcolo del rumore.

  oppure

- Secondo la definizione della Farmacopea Europea: calcolato contro un segnale del bianco come riferimento e un rumore calcolato nell'intervallo di tempo che contiene il picco per il quale viene calcolato il rapporto segnale-rumore (Signal-to-Noise, S/N).

Calcolo del rapporto segnale-rumore senza segnale di riferimento

L'intervallo più vicino al picco viene selezionato come specificato nelle impostazioni di idoneità del sistema. Sei volte la deviazione standard (sd) della regressione lineare della deriva utilizzata per il calcolo del rumore.

Il rapporto segnale-rumore viene calcolato per tutti i picchi del segnale. Se la ChemStation non riesce a trovare un valore di rumore, il rapporto segnale-rumore viene contrassegnato con “-”.

Il rapporto segnale-rumore viene quindi calcolato utilizzando la formula:

$$\text{Signal-to-Noise} = \frac{\text{Height of the peak}}{\text{Noise of closest range}}$$

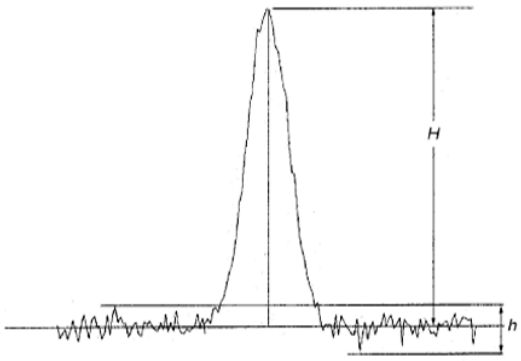

Figura 33 Rapporto segnale-rumore

Calcolo del rapporto segnale-rumore secondo la definizione della Farmacopea Europea (EF)

Il rapporto segnale-rumore (S/N) può essere calcolato attraverso la definizione della Farmacopea Europea. S/N viene calcolato utilizzando l'equazione:

$S/N = 2H/h$

Dove:

H è l'altezza del picco corrispondente al componente in questione nel cromatogramma ottenuto con la soluzione di riferimento stabilita,

h è il valore assoluto della fluttuazione più ampia del rumore rispetto alla linea di base in un cromatogramma ottenuto dopo l'iniezione di un bianco e osservato a una distanza pari a venti volte la larghezza a metà altezza del picco ottenuto nel cromatogramma eseguito con la soluzione di riferimento stabilita e situato in modo uniforme attorno alla posizione in cui dovrebbe trovarsi il picco.

Il valore del rumore utilizzato viene calcolato utilizzando il metodo "picco-picco" (vedere la sezione "Calcolo del rumore tramite la formula picco-picco" , pagina 105).

Il rapporto *S/N* viene riportato per tutti i picchi presenti nel segnale cromatografico, purché esista un corrispondente segnale di riferimento. Specificando il file di dati di riferimento per un determinato segnale cromatografico, il segnale di riferimento viene assegnato automaticamente. Se a un segnale cromatografico non può essere assegnato alcun segnale di riferimento, per i picchi in quel determinato segnale il rapporto segnale-rumore non verrà calcolato.

Determinazione dell'Intervallo del rumore

L'intervallo del rumore nel segnale di riferimento viene determinato secondo uno dei seguenti algoritmi

- Se il segnale di riferimento non è abbastanza lungo: *StartTime - EndTime* < $20*W_{0,5}$
  - *StartTime = startime (del segnale di riferimento)* e
  - *EndTime = endtime (del segnale di riferimento)*

- Se il segnale di riferimento non è abbastanza lungo, ma il picco è situato in maniera tale che *(RT-10*$W_{0,5}$)* è inferiore al punto di inizio del segnale di riferimento
  - *StartTime = startime (del segnale di riferimento)* e
  - *EndTime = StartTime + 20*$W_{0,5}$*
- Se il segnale di riferimento è abbastanza lungo, ma il picco è situato in maniera tale che *RT* o *RT+10*$W_{0,5}$* è superiore al punto di fine del segnale di riferimento
  - *EndTime = endtime (del segnale di riferimento)* e
  - *StartTime = EndTime - 20*$W_{0,5}$*
- Se il picco è situato in maniera tale che *RT* o *RT+10*$W_{0,5}$* è superiore al punto di fine del segnale di riferimento
  - *StartTime = RT - 10*$W_{0,5}$* e
  - *EndTime = RT + 10*$W_{0,5}$*

Dove:

RT è il tempo di ritenzione e

$W_{0,5}$ è l'ampiezza del picco a metà altezza.

Deriva e oscillazione

La deriva viene definita come la pendenza della regressione lineare. La deriva viene innanzitutto calcolata determinando la regressione lineare utilizzando tutti i punti di dati compresi nell'intervallo di tempo (vedere la sezione "Analisi della regressione" , pagina 129). La regressione lineare viene sottratta da tutti i punti di dati compresi nell'intervallo di tempo per fornire un segnale corretto della deriva.

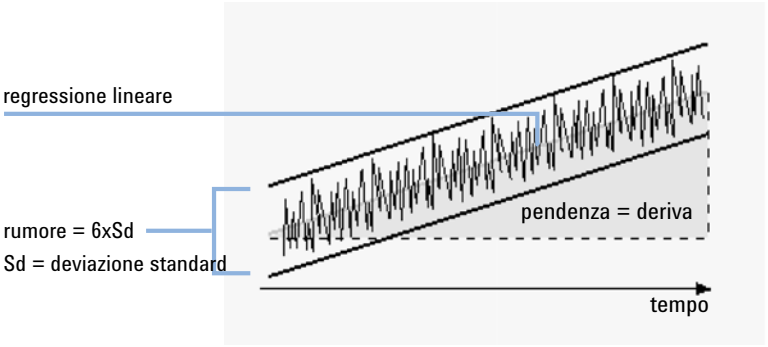

Figura 34 Deriva del rumore come sei volte la deviazione standard

L'oscillazione viene determinata come il rumore picco-picco dei valori di metà dati nei cicli di rumore di fondo secondo ASTM (vedere la sezione "Determinazione del rumore secondo il metodo ASTM" , pagina 107).

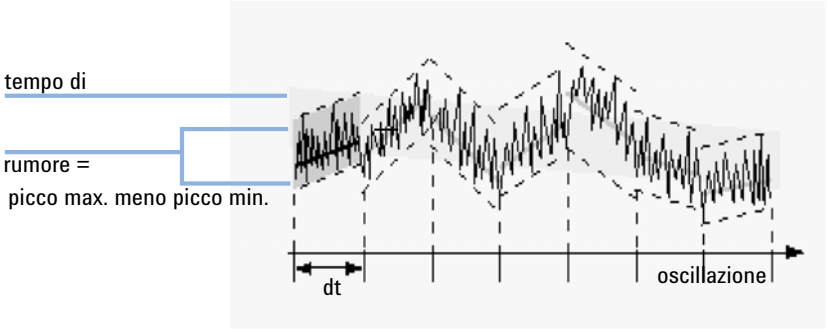

Figura 35 Oscillazione del rumore determinata secondo il metodo ASTM

Calcolo della simmetria del picco

La ChemStation non determina il rapporto di asimmetria del picco, che viene normalmente determinato confrontando la metà delle ampiezze dei picchi al 10% dell'altezza o al 5%, come consigliato dall'FDA (Food and Drug Administration).

La simmetria del picco viene calcolata come pseudomomento dall'integratore utilizzando le seguenti equazioni di momento:

$$m_1 = a_1\left(t_2 + \frac{a_1}{1.5H_f}\right)$$

$$m_2 = \frac{a_2^2}{0.5H_f + 1.5H}$$

$$m_3 = \frac{a_3^2}{0.5H_r + 1.5H}$$

$$m_4 = a_4\left(t_3 + \frac{a_4}{1.5H_r}\right)$$

$$\text{Peak symmetry} = \sqrt{\frac{m_1 + m_2}{m_3 + m_4}}$$

Se non si trova nessun punto di flesso o se ne trova solo uno, allora la simmetria del picco si calcola così:

$$\text{Peak symmetry} = \frac{a_1 + a_2}{a_3 + a_4}$$

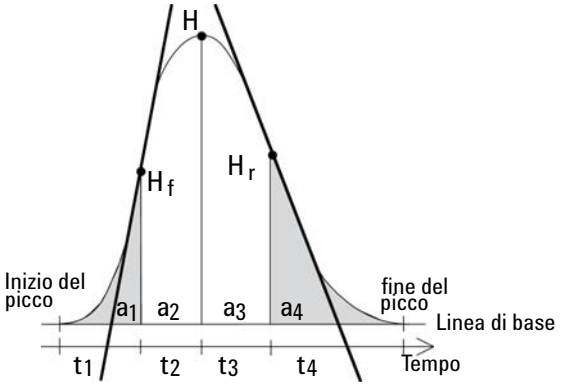

Figura 36 Calcolo del fattore di simmetria del picco

Dove:

a_i = Area della porzione

t_i = Tempo della porzione

H_f = Altezza o punto di flesso anteriore

H_r = Altezza o punto di flesso posteriore

H = Altezza all'apice

Formule e calcoli di idoneità del sistema

La ChemStation utilizza le formule seguenti per ottenere i risultati dei vari test di idoneità del sistema. I risultati vengono illustrati utilizzando gli stili di report **Performance**, **Performance+Noise**, **Performance+LibSearch** e **Extended Performance**.

Quando per una definizione si specifica ASTM o USP, allora la definizione sarà conforme a quelle date nei testi di riferimento corrispondenti. Tuttavia i simboli usati in questo manuale possono non essere gli stessi dei testi di riferimento.

I riferimenti usati in questo contesto sono:

- *ASTM: Section E 682 – 93, Annual Book of ASTM Standards, Vol.14.01*
- *USP: The United States Pharmacopeia, XX. Revision, pp. 943 - 946*
- *EP: Farmacopea Europea, 7.a edizione*
- *JP: Farmacopea Giapponese, 15.a edizione*

Definizioni generali

Volume vuoto

$$V = d^2 \pi l (f / 4)$$

Dove:

d = Diametro della colonna [cm]

π = Costante, rapporto fra la circonferenza e il diametro di un cerchio.

l = Lunghezza della colonna [cm]

f = Frazione del volume della colonna non preso da una fase stazionaria ma disponibile come fase mobile; valore predefinito f = 0,68 (per la colonna modello Hypersil)

Tempo di ritenzione di un composto non ritenuto t (m) [min]

(Chiamato anche tempo morto o vuoto)

$$T_m = V / F$$

Dove:

F = Flusso in cromatografia liquida [ml/min]

Definizioni di test sulle prestazioni

Le prestazioni dei picchi possono essere calcolate sia per ogni picco integrato dai dati caricati sia per picchi nuovi integrati manualmente. L'apposito strumento interattivo calcola le caratteristiche dei picchi e le visualizza sull'interfaccia utente.

Momenti statistici

$$M0 = d_t \cdot X$$

$$M1 = t_0 + d_t \cdot \frac{Y}{X}$$

$$M2 = \frac{d_t^2}{X} \cdot \sum_{i=1}^{N} \left(\left(i - 1 - \frac{Y}{X} \right)^2 \cdot A_i \right)$$

$$M3 = \frac{d_t^3}{X} \cdot \sum_{i=1}^{N} \left(\left(i - 1 - \frac{Y}{X} \right)^3 \cdot A_i \right)$$

$$M4 = \frac{d_t^4}{X} \cdot \sum_{i=1}^{N} \left(\left(i - 1 - \frac{Y}{X} \right)^4 \cdot A_i \right)$$

dove:

N = Numero di porzioni di area

A_i = Valore (risposta) della porzione di area indicato da i

d_t = Intervallo di tempo tra porzioni di area adiacenti

t_0 = Tempo della prima porzione di area

$\sum_{i=1}^{N}$ = Sommatoria dall'indice iniziale 1 all'indice finale N per le osservazioni discrete

$$X = \sum_{i=1}^{N} \quad X = \sum_{i=1}^{N} (A_i)$$

$$Y = \sum_{i=1}^{N} (\quad Y = \sum_{i=1}^{N} ((i-1)A_i)$$

Momenti statistici, disallineamento ed eccesso

I momenti statistici sono utilizzati come alternativa per descrivere forme di picchi asimmetriche. Esiste un numero infinito di momenti del picco, ma solo i primi cinque sono utilizzati in relazione ai picchi cromatografici. Sono chiamati Momento 0^o, Momento 1^o, ... Momento 4^o.

Il Momento 0^o rappresenta l'area del picco.

Il Momento 1^o è il tempo di ritenzione medio, o il tempo di ritenzione misurato al centro di gravità del picco. Questo valore è diverso dal tempo di ritenzione cromatografica misurato al massimo del picco se il picco non è simmetrico.

Il Momento 2^o è la varianza del picco, cioè una misura della diffusione laterale. È la somma della varianza con il contributo di diverse parti del sistema.

Il Momento 3^o descrive la simmetria verticale o il disallineamento. È la misura del distacco della forma del picco dallo standard gaussiano. Il disallineamento dato nel report Prestazioni + Esteso è la sua forma senza dimensioni. Un picco simmetrico ha un disallineamento uguale a zero. I picchi scodati hanno un disallineamento positivo e il Momento 1 è maggiore del tempo di ritenzione. I picchi con fronte anteriore hanno un disallineamento negativo ed il loro Momento 1 è minore del tempo di ritenzione.

Il Momento 4^o o eccesso è una misura della compressione o dell'allungamento del picco lungo un asse verticale e di come può essere comparato ad uno standard gaussiano per il quale il Momento 4 equivale a zero. Può essere visualizzato muovendo o tirando lateralmente un picco gaussiano mantenendo l'area costante. Se il picco viene compresso o schiacciato per una comparazione, il

suo eccesso sarà negativo. Se è più alto il suo eccesso sarà positivo. Anche l'eccesso viene incluso nel report Prestazioni + Esteso nella sua forma senza dimensioni.

Ampiezza reale del picco W_x [min]

$$W_x = \text{width of peak at height x \% of total height}$$

W_b	Ampiezza base, sigma 4, ottenuta intersecando le tangenti attraverso i punti di flesso con la linea di base (ampiezza picco tangente)
$W_{4,4}$	Ampiezza al 4,4% dell'altezza (ampiezza sigma 5)
$W_{5,0}$	Ampiezza al 5% dell'altezza (ampiezza del picco che scoda), utilizzata per il fattore di scodamento USP
$W_{50.0}$	Ampiezza al 50% dell'altezza (ampiezza effettiva del picco a metà altezza o 2.35 sigma).

Fattore di capacità (USP), Rapporto di capacità (ASTM) k'

$$k' = \frac{T_R - T_0}{T_0}$$

Dove:

T_R = Tempo di ritenzione del picco [min]

T_0 = Tempo morto [min]

Fattore di scodamento t (USP)

NOTA Il fattore di simmetria (JP) e il fattore S di simmetria (EP) sono uguali al fattore di scodamento (USP). Sono tutti disponibili come "Peak_TailFactor" in Intelligent Reporting. Vedere anche la sezione "Reporting dei fattori della Farmacopea in ChemStation" , pagina 166.

$$t = \frac{W_{5.0}}{t_w \cdot 2}$$

dove:

t_w = Distanza in min dalla parte anteriore del picco e T_R, misurato al 5% dell'altezza del picco

$W_{5,0}$ = Ampiezza del picco al 5% dell'altezza [min]

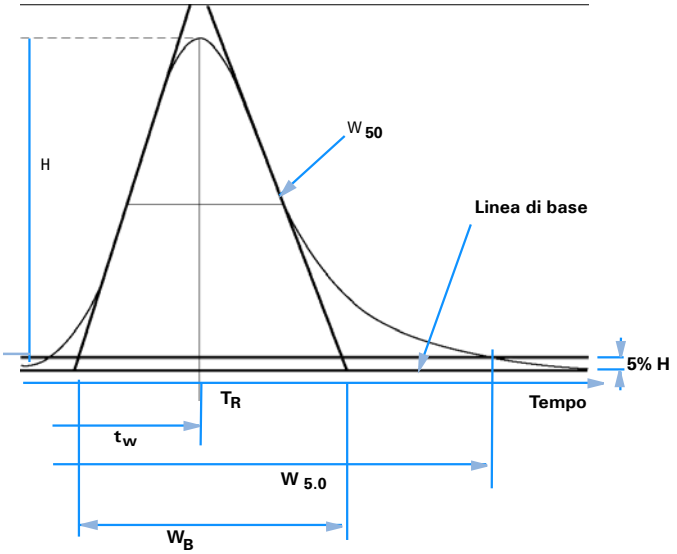

Figura 37 Parametri delle prestazioni

Numero di piatti teorici n per colonna (USP, ASTM)

Metodo della tangente (USP, ASTM):

$$n = 16\left(\frac{T_R}{W_B}\right)^2$$

dove:

W_B = ampiezza della base [min]

Metodo di metà altezza (ASTM, EP):

$$n = 5.54\left(\frac{T_R}{W_{50}}\right)^2$$

dove:

W_{50} = ampiezza del picco a metà altezza [min]

Metodo di metà altezza (ASTM, JP):

$$n = 5.55\left(\frac{T_R}{W_{50}}\right)^2$$

dove:

W_{50} = ampiezza del picco a metà altezza [min]

Metodo del Sigma 5:

$$n = 25\left(\frac{T_R}{W_{4.4}}\right)^2$$

dove:

$W_{4,4}$ = ampiezza del picco al 4,4% dell'altezza [min]

Metodo statistico:

$$n = \frac{M1^2}{M2}$$

dove:

Mx = x ^{esimi} del momento statistico

Metodo di Foley e Dorsey

L'equazione di Foley e Dorsey viene utilizzata per picchi asimmetrici. Corregge il calcolo dei piatti in caso di picchi scodati e slargati.

$N_{sys} = 41{,}7\ (T_R/W_{10})\ /\ A/B + 1{,}25$

Dove:

- W_{10} = ampiezza del picco al 10% dell'altezza
- A/B = fattore di asimmetria empirico, con A+B = W_{10} e A: frontale e B: scodamento

Numero di piatti teorici al metro N [1/m]

$$N = 100 \times \frac{n}{l}$$

Dove:

n = Numero di piatti teorici

l = Lunghezza della colonna [cm]

Ritenzione relativa (USP, ASTM), alfa di selettività

NOTA Nei rapporti la ritenzione relativa (USP) è disponibile come "Selectivity" o "Peak_Selectivity".

(Pertinente ai picchi a e b, T_R del picco a < T_R del picco b)

$$\text{alpha} = \frac{k'_{(b)}}{k'_{(a)}}, \text{alpha} \geq 1$$

dove:

$k'_{(x)}$ = fattore di capacità per il picco x: t_{Rx}-t_0/t_0

Ritenzione relativa (EP, JP)

La ritenzione relativa (corretta) secondo EP e il fattore di separazione secondo JP vengono calcolati utilizzando la stessa formula:

$$r = \frac{t_{Ri} - t_M}{t_{Rst} - t_M}$$

Dove:

t_{Ri} = tempo di ritenzione del picco di interesse

t_{Rst} = tempo di ritenzione del picco di riferimento

t_M = tempo morto

La ritenzione relativa (corretta, EP) e il fattore di separazione (JP) sono disponibili in Intelligent Reporting come “RelativeRetTime_EP” e in Classic Reporting come “Selectivity”.

La ritenzione relativa (non corretta) secondo EP viene calcolata come

$r_G = t_{Ri} / t_{Rst}$

Risoluzione R (USP, ASTM)

(Relativa a picchi a e b, T_R del picco a < T_R del picco b; T_R in min)

Metodo della tangente (USP, ASTM):

$$R = \frac{2(T_{R(b)} - T_{R(a)})}{W_{B(b)} + W_{B(a)}}$$

Risoluzione Rs (EP/JP)

Metodo dell'ampiezza a metà altezza (risoluzione utilizzata nel report sulle prestazioni):

La ChemStation calcola la risoluzione secondo JP ed EP in base alla definizione seguente:

$Rs = 1{,}18 \times (t_{R2} - t_{R1}) / (W_{0,5h1} + W_{0,5h2})$

NOTA

La definizione della risoluzione in USP differisce dalla definizione delle Farmacopee Europea (EP) e Giapponese (JP). I calcoli EP e JP sono disponibili a partire dalla ChemStation Edition C.01.04.

Inoltre Classic Resolution (2.35/2)*... è disponibile per Intelligent Reporting come Peak_Resolution_Classic. Per un elenco completo dei valori vedere "Reporting dei fattori della Farmacopea in ChemStation" , pagina 166

Risoluzione (definizioni classiche della ChemStation)

Metodo di metà altezza:

$$R = \frac{(2.35/2)(T_{R(b)} - T_{R(a)})}{W_{50(b)} + W_{50(a)}}$$

Metodo del Sigma 5:

$$R = \frac{2.5(T_{R(b)} - T_{R(a)})}{W_{4.4(b)} + W_{4.4(a)}}$$

Metodo statistico:

$$R = \frac{M1_{(b)} - M1_{(a)}}{W_{S(b)} + W_{S(a)}}$$

dove:

$M1_{(x)}$ = tempo di ritenzione medio per il picco x (Momento statistico 1) [min]

$W_{B(x)}$ = ampiezza di base per il picco x [min]

$W_{4,4(x)}$ = ampiezza al 4,4% dell'altezza per il picco x [min]

$W_{50(x)}$ = ampiezza al 50% dell'altezza per il picco x [min]

$W_S(x)$ = ampiezza derivata da momenti statistici = $\sqrt{(M2)}$ per picco x [min] (vedere anche la sezione “Momenti statistici” , pagina 117)

Definizioni per la riproducibilità

Per la revisione statistica dei dati analitici in termini di riproducibilità, la sequenza è considerata un campione casuale di piccole dimensioni preso da un numero infinito di possibili risultati sperimentali. Per ottenere un gruppo completo di risultati sarebbe necessario disporre di una quantità illimitata di materiale campione e di tempo. Dati rigorosamente statistici si applicano unicamente ad un gruppo o ad una popolazione di dati completi e auto-contenuti. Quindi un requisito essenziale di tale trattamento è che il campione selezionato venga considerato rappresentativo di tutti i dati.

Media campione M

Il valore di media M di un campione casuale consistente di N misurazioni viene calcolato da questo gruppo limitato di N valori singoli osservati X_i indicizzati con un indicatore consecutivo i secondo la seguente formula:

$$M = \frac{\sum_{i=1}^{N} X_i}{N}$$

Dove:

N = numero di osservazioni discrete

X_i = Valore di osservazioni discrete indicate da i

Deviazione standard S del campione

Consideriamo un campione casuale di dimensioni N. La deviazione standard S del campione per il campione finito scelto, preso da una popolazione di dati di grandi dimensioni, è determinato da

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N} (X_i - M)^2}{N-1}}$$

La deviazione standard S del campione differisce in due punti dalla deviazione standard s dell'intera popolazione:

- invece del valore reale di media viene utilizzato solo il valore di media M del campione e
- divisione per N-1 invece di N.

Deviazione standard relativa RSD[%] (USP)

La deviazione relativa standard è definita come

$$RSD = 100\frac{S}{M}$$

Deviazione standard della media S_M

Detta M la media del campione e S la deviazione standard dello stesso [o (N-1)]. La deviazione standard S_M della media del campione M è determinata da

$$S_M = \frac{S}{\sqrt{N}}$$

Ciò può essere meglio illustrato da un esempio.

Mentre il tempo di ritenzione di un determinato composto può deviare leggermente dal valore di media calcolato durante una sequenza, i dati di un'altra sequenza possono differire in maniera più significativa a causa, ad esempio, delle modifiche della temperatura dell'ambiente, del degrado del materiale con il quale è stata fabbricata la colonna, ecc. Per determinare questa deviazione, la deviazione standard della media del campione S_M può essere calcolata in base alla seguente formula.

Intervallo di confidenza CI

L'intervallo di confidenza viene calcolato per fornire informazioni sulla precisione della stima di un valore di media, quando lo si applica all'intera popolazione e non solo ad un campione.

L'intervallo di confidenza 100 × (1 - α) % per la media globale è dato da

$$CI = t_{(\alpha/2);N-1} \cdot S_M$$

dove:

$t_{(\alpha/2);N-1}$

Punto percentuale della tavola di distribuzione t ad una probabilità di rischio pari a α

Per la statistica estesa riportata nel report riassuntivo di sequenza, deve essere usato l'intervallo di confidenza del 95% (α = 0.05).

La distribuzione t (o 'distribuzione di Student') deve essere utilizzata per volumi di campione ridotti. In caso di volumi di campioni elevati, i risultati della distribuzione t e la normale distribuzione (gaussiana) non risultano più diversi. Quindi, in caso di 30 o più campioni, può essere usata, in sostituzione, la normale distribuzione. (Poiché sarebbe estremamente laborioso calcolare la distribuzione t per numeri elevati, la distribuzione normale costituisce la migliore approssimazione.)

Intervallo di confidenza del 95% per 6 campioni:

1 - α = 0.95

N = 6

Il valore corretto di t è stato preso dalla tavola di distribuzione t per 5 (N-1) gradi di libertà e per il valore α/2, pari a 0,025. Ciò darà la seguente formula di calcolo per il CI:

$$CI = 2.571 \cdot \frac{1}{\sqrt{6}} \cdot S_M$$

Analisi della regressione

Dato:

N = number of discrete observations

X_i = independent variable, i^{th} observation

Y_i = dependent variable, i^{th} observation

Funzione lineare:

$$y_{(X)} = a + bX$$

Coefficienti:

$$a = \frac{1}{\Delta_X}\left(\sum_{i=1}^{N} X_i^2 \cdot \sum_{i=1}^{N} Y_i - \left(\sum_{i=1}^{N} X_i \cdot \sum_{i=1}^{N} X_i Y_i\right)\right)$$

$$b = \frac{1}{\Delta_X}\left(N \cdot \sum_{i=1}^{N} X_i Y_i - \left(\sum_{i=1}^{N} X_i \cdot \sum_{i=1}^{N} Y_i\right)\right)$$

Dove:

$$\Delta_X = N \cdot \sum_{i=1}^{N} X_i^2 - \left(\sum_{i=1}^{N} X_i\right)^2$$

Coefficiente di regressione

$$r = \frac{\left(N \cdot \sum_{i=1}^{N} X_i Y_i - \sum_{i=1}^{N} X_i \cdot \sum_{i=1}^{N} Y_i \right)}{\sqrt{\Delta_x \cdot \Delta_y}}$$

Dove:

$$\Delta_Y = N \cdot \sum_{i=1}^{N} Y_i^2 - \left(\sum_{i=1}^{N} Y_i \right)^2$$

Deviazione standard (S)

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N} \{Y_i - a - bX_i\}^2}{N-2}}$$

Accesso ai numeri a doppia precisione memorizzati internamente

Se, per scopi di validazione, fosse necessario ricalcolare manualmente i risultati ottenuti dalla ChemStation, come le curve di calibrazione, i coefficienti di correlazione, i piatti teorici, ecc. è necessario tenere conto del formato numerico utilizzato dalla ChemStation.

Per tutti i numeri salvati all'interno della ChemStation viene utilizzato il tipo di dati “C” DOUBLE. Ciò significa che vengono memorizzate 14 cifre significative per ogni numero. L'implementazione di questo tipo di dati segue l'adozione da parte di Microsoft dello standard IEEE per il tipo di dati “C” e delle regole di arrotondamento ad esso associate (consultare i documenti Microsoft Q42980, Q145889 e Q125056).

Dato che può essere utilizzato un numero illimitato di parametri per il calcolo della tavola di calibrazione, non è possibile calcolare l'esatta entità dell'errore probabilmente introdotto dalla propagazione e dall'accumulo di errori di arrotondamento. Tuttavia una verifica intensiva tramite diverse curve di calibrazione ha dimostrato che può essere garantita un'accuratezza di un massimo di 10 caratteri numerici. Dal momento che la ripetibilità dell'area, dell'altezza e del tempo di ritenzione di un'analisi cromatografica ha di solito 3 cifre significative, 10 cifre significative all'interno del calcolo sono in genere sufficienti. Per questa ragione la tavola di calibrazione e le altre tavole visualizzano un massimo di 10 cifre significative.

Se per la validazione è richiesto un calcolo esterno (manuale), si consiglia di utilizzare tutte le cifre usate per il calcolo interno. L'uso dei dati visualizzati e/o arrotondati per i calcoli esterni può produrre risultati diversi da quelli prodotti dalla ChemStation, a causa degli errori di arrotondamento.

Il paragrafo che segue descrive come accedere a tutte le cifre memorizzate internamente che di solito sono richieste per i calcoli manuali. In tutti i casi deve essere caricato un file di dati e deve essere prodotto un report con lo stile adatto prima dell'esecuzione del comando elencato. Tutti i comandi vengono inseriti sull'apposita riga di comando della ChemStation, che può essere abilitata dal menu Visualizza. Le informazioni contenute nel file “C:\CHEM32\TEMP.TXT” possono essere visualizzate utilizzando Blocco Note o un elaboratore di testi adatto.

Informazioni sui picchi non elaborati:

- Tempo di ritenzione
- Area
- Altezza
- Ampiezza (integratore)
- Simmetria
- Tempo di inizio del picco
- Tempo di fine del picco

Sulla riga di comando digitare:

```
DUMPTABLE CHROMREG, INTRESULTS,"C:\CHEM32\1\TEMP\
INTRES.TXT"
```

Informazioni sul picco elaborato:

- Tempo di ritenzione misurato
- Tempo di ritenzione atteso
- Area
- Altezza
- Ampiezza (integratore)
- Simmetria
- Metà ampiezza - Metà altezza del picco (Prestazioni e Prestazioni + Esteso)
- Fattore di scodamento (Prestazioni e Prestazioni + Esteso)
- Selettività (Prestazioni e Prestazioni + Esteso)
- K` (Prestazioni + Esteso)
- Ampiezza del picco tangente (Prestazioni + Esteso)
- Disallineamento (Prestazioni + Esteso)
- Piatti teorici - Metà altezza (Prestazioni e Prestazioni + Esteso)
- Piatti teorici - Tangente (Prestazioni + Esteso)
- Piatti teorici – Sigma 5 (Prestazioni + Esteso)
- Piatti teorici - Statistico (Prestazioni + Esteso)
- Risoluzione - Metà altezza (Prestazioni e Prestazioni + Esteso)
- Risoluzione - Tangente (Prestazioni + Esteso)

- Risoluzione – Sigma 5 (Prestazioni + Esteso)
- Risoluzione - Statistico (Prestazioni + Esteso)

Sulla riga di comando digitare:

```
DUMPTABLE CHROMRES, PEAK,"C:\CHEM32\1\TEMP\PEAK.TXT"
```

Informazioni sul composto elaborato:

- Quantità calcolata

Sulla riga di comando digitare:

DUMPTABLE CHROMRES, COMPOUND,"C:\CHEM32\1\TEMP\COMPOUND.TXT"

Informazioni sulla tavola di calibrazione:

- Livello numerico
- Quantità
- Area
- Altezza

Sulla riga di comando digitare:

```
DUMPTABLE _DAMETHOD, CALPOINT,"C:\CHEM32\1\TEMP\CALIB.TXT"
```

Informazioni sulla regressione lineare:

- Intercetta Y (CurveParm1)
- Pendenza (CurveParm2)
- Coefficiente di correlazione

Sulla riga di comando digitare:

```
DUMPTABLE _DAMETHOD, PEAK,"C:\CHEM32\1\TEMP\REGRESS.TXT"
```

7
Calcoli specifici per CE

Tavole di calibrazione 136
- Calibrazione standard 136
- Calibrazione mediante peso molecolare delle proteine 137
- Calibrazione mediante coppia di basi del DNA 137
- Focalizzazione isoelettrica capillare 138

Calibrazione mediante correzione della mobilità 139
- Introduzione 139
- Calcoli di mobilità effettiva 140
- Calcoli di mobilità relativa 143

Stili di rapporto speciali per elettroforesi capillare 145

Aree del picco corrette 146

Applicabilità del sistema per elettroforesi capillare 147
- Fattore di capacità k' 147

CE-MSD 148
- Sottrazione del fondo 148

Questo capitolo è pertinente solo se si utilizza ChemStation per controllare gli strumenti CE.

Tavole di calibrazione

Nell'elenco a discesa relativo alla tavola di calibrazione sono disponibili quattro tipi diversi di calibrazione.

Calibrazione standard

La calibrazione standard è basata sull'area del picco o sull'altezza del picco. Selezionando **Standard Calibration**, sono disponibili le opzioni **Calculate Signals Separately** e **Calculate with Corrected Areas**.

Selezionare l'opzione di calcolo con aree corrette per far sì che, nel calcolo dei rapporti di normalizzazione percentuale (Norm%), il valore percentuale dei segnali indicati separatamente corrisponda a 100% per ogni segnale. Se l'opzione **Calculate signals separately** è deselezionata, il valore percentuale di tutti i segnali corrisponde a 100%. È necessario selezionare **Calculate signals separately** per eseguire l'ordinamento in base al segnale nella tavola di calibrazione.

Selezionare **Calculate with Corrected Areas** per apportare una correzione all'area del picco in base al tempo di migrazione. In questa modalità, l'area viene divisa in base al tempo di migrazione per migliorare la riproducibilità nell'analisi quantitativa in caso di instabilità dei tempi di migrazione.

Oltre alla calibrazione standard, sono disponibili tre calibrazioni specifiche per l'elettroforesi capillare caratterizzate da un segnale basato sul tempo di migrazione. Il segnale viene definito dalla descrizione del segnale nel metodo di calibrazione. Se il file di dati contiene più segnali, può essere selezionato soltanto un segnale che viene estratto dal file di dati. Il formato della tavola di calibrazione dipende dal tipo di calibrazione selezionato.

Le operazioni di quantificazione possono essere eseguite basandosi sulla calibrazione in base alla taglia del biopolimero (diagramma di Ferguson) per proteina-SDS.

Calibrazione mediante peso molecolare delle proteine

La **Protein molecular weight calibration** richiede uno standard di calibrazione con componenti di pesi molecolari noti e un picco di riferimento. L'equazione di calibrazione è la seguente:

$$\log(MW) = k_1 \cdot (t_{ref}/t) + k_0$$

Dove:

MW è il peso molecolare.

t_{ref} è il tempo di migrazione del picco di riferimento

t è il tempo di migrazione.

k_0 e k_1 sono i coefficienti dell'equazione lineare

La tavola di calibrazione contiene il nome, il tempo di migrazione, t_{ref}/t (tempo di migrazione relativo), il peso molecolare e *log(MW)* per ogni componente.

Calibrazione mediante coppia di basi del DNA

La **DNA base-pair calibration** è simile alla **protein molecular weight calibration**, ma non usa alcun picco di riferimento. Richiede uno standard di calibrazione con un numero noto di coppie di basi. L'equazione di calibrazione è la seguente:

$$\log(\#BP) = k_1 \cdot 1/t + k_0$$

Dove:

#BP è il numero di coppie di basi.

t è il tempo di migrazione.

k_0 e k_1 sono i coefficienti dell'equazione lineare.

La tavola di calibrazione contiene il nome, il tempo di migrazione, *1/t*, le coppie di basi e *log(coppie di base)* per ogni componente.

Focalizzazione isoelettrica capillare

La **capillary isoelectric focusing calibration** (cIEF) richiede uno standard di calibrazione con proteine standard di punti isoelettrici (pl) noti. L'equazione di calibrazione è la seguente:

$$pI = k_1 \cdot t + k_0$$

Dove:

pl è il punto isoelettrico.

t è il tempo di migrazione.

k_0 e k_1 sono i coefficienti dell'equazione lineare.

La tavola di calibrazione contiene il nome, il tempo di migrazione e il punto isoelettrico *pI* per ogni componente.

Calibrazione mediante correzione della mobilità

Introduzione

Piccole modifiche nella composizione del tampone, nella temperatura o nella viscosità, nonché l'adsorbimento nella parete capillare, possono condizionare il flusso elettrosmotico (EOF) e renderlo instabile. La conseguente modifica dell'EOF può creare una considerevole deviazione standard dei tempi di migrazione. Le correzioni della mobilità consentono di ridurre notevolmente l'effetto dei cambiamenti del tempo di migrazione da un'analisi all'altra, mediante il monitoraggio del tempo di migrazione di un picco di riferimento della mobilità e l'aumento significativo della riproducibilità del tempo di migrazione.

È consigliabile scegliere il picco di riferimento della mobilità in base alle priorità seguenti:

- Selezionare il picco con il segnale più alto.
- Selezionare il picco più isolato.
- Il marker EOF o lo standard interno possono essere usati come picco di riferimento della mobilità.
- Ingrandire la finestra di ricerca in modo da individuare sempre il picco di riferimento della mobilità.
- Se diversi picchi sono indicati nella finestra di ricerca, il picco con il segnale più alto viene selezionato automaticamente come picco di riferimento della mobilità.

Sono disponibili due tipi di correzione della mobilità:

Correzione della mobilità effettiva Questo tipo di **Effective Mobility Correction** usa le mobilità effettive di tutti i picchi e richiede la disponibilità dei dati della rampa di tensione unitamente all'elettroferogramma. Inoltre, la correzione della mobilità effettiva consente di determinare le mobilità effettive vere di tutti i componenti del campione.

Correzione della mobilità relativa Questo **Relative Mobility Correction** non richiede i dati di tensione e utilizza una tensione costante per tutte le misurazioni.

Calcoli di mobilità effettiva

Oltre a un picco di riferimento, i requisiti per la correzione della mobilità effettiva includono un marker neutro che corrisponde alla velocità del flusso elettrosmotico (EOF). Di seguito sono riportati alcuni marker usati comunemente e le relative lunghezze d'onda.

Tabella 8 Marker EOF comunemente usati

Composto	Lunghezza d'onda
1-Propanolo	210 nm
Acetone	330 nm
Acetonitrile	190 nm
Benzene	280 nm
Guanosina	252 nm
Ossido di mesitile	253 nm
Metanolo	205 nm
Fenolo	218 nm
Piridina	315 nm
Tetraidrofurano	212 nm
Uracile	259 nm

I dati relativi alla tensione e le dimensioni capillari possono essere salvati assieme al file di dati o essere immessi manualmente durante l'impostazione della tavola di calibrazione. La memorizzazione dei dati di tensione durante l'analisi comporta una maggiore accuratezza. Accertarsi di memorizzare anche le dimensioni capillari con il metodo. Per rielaborare i segnali acquisiti senza dati di tensione/dimensioni capillari, immettere manualmente la tensione e il tempo di passaggio nel campo Tensione e dimensioni capillari della finestra di dialogo.

In base ai dati, viene determinata la mobilità effettiva per ogni componente.

Informazioni generali

La mobilità apparente di un picco di campione è definita dall'equazione seguente:

$$\mu_{app} = (l \cdot L)/(t \cdot V(t))$$

dove

l è la lunghezza effettiva del capillare (la lunghezza dal punto di iniezione al punto di rivelazione).

L è la lunghezza totale del capillare.

V(t) è la tensione media dal tempo 0 al tempo di migrazione t del picco.

La tensione media è calcolata a partire dalla tensione misurata o dalla rampa di tensione specificata nel metodo mediante le equazioni seguenti:

Se $t < t_R$,

$$V(t) = V/(2 \cdot t_R) \cdot t$$

Se $t > t_R$,

$$V(t) = V \cdot (1 - t_R/(2 \cdot t))$$

dove

t è il tempo di migrazione del picco

t_R è il tempo di passaggio

V è la tensione finale

L'equazione della mobilità può essere semplificata mediante l'introduzione di un coefficiente:

$$k(t) = (l \times L)/V(t)$$

La mobilità relativa o apparente diventa

$$\mu_{app} = k(t)/t$$

La mobilità effettiva o reale diventa

$$\mu_{real} = \mu_{app} - \mu_{EOF}$$

dove

$\propto_{app}$ è la mobilità apparente di qualsiasi picco

$\propto_{EOF}$ è la mobilità apparente di un marker neutro

I componenti con velocità inferiore all'EOF (solitamente anioni) saranno caratterizzati da valori di mobilità effettiva negativi.

Calibrazione

La mobilità reale di un picco di campione, da usare come picco di riferimento della mobilità nelle misurazioni successive, viene calcolata mediante il tempo di migrazione di un marker neutro (μ_{EOF}):

$$\mu_{\mathrm{real}ref} = \mu_{appref} - \mu_{EOF} = k(t_{ref})/t_{ref} - k(t_{EOF})/t_{EOF}$$

Le mobilità effettive di tutti i picchi vengono quindi calcolate e memorizzate come mobilità attese:

$$\mu_{\mathrm{real}N} = \mu_{appN} - \mu_{EOF} = k(t_N)/t_N - k(t_{EOF})/t_{EOF}$$

La tavola di calibrazione conterrà il tempo di migrazione misurato e la mobilità reale calcolata per ogni composto nelle colonne relative al tempo di migrazione atteso e alla mobilità attesa.

Calcolo della mobilità

Il valore reale di μ_{EOF} viene calcolato mediante il picco di riferimento della mobilità:

$$\mu_{EOFact} = \mu_{appref} - \mu_{\mathrm{real}ref} = k(t_{ref})/t_{ref} - \mu_{\mathrm{real}ref}$$

Quindi il tempo di migrazione atteso per ogni picco viene regolato:

$$t_{new\,\mathrm{exp}N} = k(t_{old\,\mathrm{exp}N})/(\mu_{\mathrm{real}N} + \mu_{EOFact})$$

I valori calcolati vengono usati per l'identificazione dei picchi e sostituiscono i valori presenti nella tavola di calibrazione.

Ricalibrazione

Il tempo di migrazione del picco di riferimento della mobilità viene usato per calcolare il valore reale di μ_{EOF}:

$$\mu_{EOFact} = \mu_{appref} - \mu_{realref} = k(t_{ref})/t_{ref} - \mu_{realref}$$

Il tempo di migrazione atteso per ogni picco viene regolato:

$$t_{newexpN} = k(t_{oldexpN})/(\mu_{realN} + \mu_{EOFact})$$

e le mobilità vengono aggiornate:

$$\mu_{realN} = \mu_{appN} - \mu_{EOFact}$$

Durante la calibrazione, i valori attesi per il tempo di migrazione e i valori di mobilità reale vengono aggiornati nella tavola di calibrazione.

Calcoli di mobilità relativa

È possibile eseguire anche la correzione del tempo di migrazione in base alle mobilità relative. In questo caso il marker EOF, la tensione e le dimensioni capillari non sono necessari. Il software esegue la correzione del tempo di migrazione ma non visualizza i valori di mobilità.

Informazioni generali

Come nei calcoli di mobilità effettiva, il coefficiente

$$k(t) = (l \cdot L)/V(t)$$

viene usato nei calcoli di mobilità relativa per descrivere la relazione tra mobilità e tempo di migrazione:

$$\mu_{app} = k(t)/t$$

La differenza è data dal fatto che, nelle equazioni della mobilità relativa, il fattore k appare sia nel numeratore sia nel denominatore di una frazione. Pertanto la dimensione capillare può essere eliminata. Il fattore k è calcolato nel modo seguente:

$$k(t) = 1/V(t)$$

Dove *V(t)* è la tensione media dal tempo 0 al tempo di migrazione t del picco.

Quando il parametro della tensione è impostato su **Ignore**, il fattore *k* è una costante e può essere eliminato dalle equazioni relative al tempo di migrazione atteso (come illustrato di seguito).

Le equazioni seguenti descrivono il caso generale per $k = k(t)$, sebbene il software prenda in considerazione tutti i casi durante il calcolo del fattore k.

Calibrazione

Un picco di riferimento della mobilità viene identificato e il relativo tempo di migrazione (t_{refcal}) viene memorizzato. I tempi di migrazione attesi ($t_{expcalN}$) di tutti gli altri picchi vengono salvati.

Calcolo della mobilità

Dopo la rivelazione del picco di riferimento, il tempo di migrazione atteso per ogni picco viene regolato in base al tempo di migrazione reale del picco di riferimento della mobilità:

$$t_{newexpN} = \frac{k(t_{oldexpN})}{(k(t_{expcalN})/t_{expcalN} - k(t_{refcal})/t_{refcal} + k(t_{refact})/t_{refact})}$$

Quindi il tempo di migrazione del picco di riferimento dall'ultima calibrazione viene aggiornato:

$$t_{refcal} = t_{refact}$$

Stili di rapporto speciali per elettroforesi capillare

I seguenti stili di rapporto sono stati aggiunti alla ChemStation Agilent per sistemi CE:

Mobilità CE

CE Mobility include i risultati quantitativi, in particolare la mobilità apparente. Per utilizzare questo stile di rapporto, è necessario fornire le informazioni sul capillare utilizzato prima dell'acquisizione ed è stato memorizzato il segnale di tensione. La mobilità apparente viene calcolata in base alla formula seguente:

$$\mu_{app} = \frac{l \cdot L}{t \cdot V}$$

Dove:

l è la lunghezza effettiva del capillare (cm).

L è la lunghezza totale del capillare (cm).

t è il tempo di migrazione (min).

V è la tensione (kV).

Se la correzione della mobilità effettiva (consultare la sezione “Calcoli di mobilità effettiva” , pagina 140) è attivata, nei rapporti semplici (ad esempio, rapporti standard esterni) la colonna del tipo di picco viene sostituita da una colonna relativa alla mobilità. Il rapporto di mobilità CE stampa le mobilità effettive anziché quelle apparenti.

Aree del picco corrette

La ChemStation Agilent per sistemi CE consente di usare le aree del picco corrette invece dei calcoli di area normali. Tali aree vengono utilizzate per la calibrazione standard e i rapporti.

Per attivare questa funzione, selezionare **Calculate with Corrected Areas** per apportare una correzione all'area del picco in base al tempo di migrazione. In questa modalità, l'area viene divisa in base al tempo di migrazione per migliorare la riproducibilità nell'analisi quantitativa in caso di instabilità dei tempi di migrazione.

L'area corretta viene calcolata in base alla formula seguente:

$$A_c = \frac{A}{60 \cdot t}$$

Dove:

Ac è l'area del picco corretta (mAU).

A è l'area del picco (mAU·sec).

t è il tempo di migrazione (min).

Talvolta l'area corretta viene denominata anche area normalizzata.

Applicabilità del sistema per elettroforesi capillare

Fattore di capacità k'

Nell'elettroforesi capillare, il valore del fattore di capacità k' non può essere calcolato automaticamente per tutte le modalità operative. Consultare il manuale *High Performance Capillary Electrophoresis:* A Primer for the formulas respectively. I valori indicati nei rapporti sono validi solo per la ChemStation Agilent per sistemi LC 3D, poiché la ChemStation Agilent per sistemi CE usa gli stessi algoritmi della ChemStation Agilent per sistemi LC 3D.

CE-MSD

Sottrazione del fondo

Quando si seleziona l'opzione di menu **Subtract Background**, l'ultimo spettro di massa selezionato viene sottratto da ogni punto nell'elettroferogramma corrente. I dati che ne derivano vengono salvati nella stessa directory e con lo stesso nome del file di dati originale. L'estensione di file, tuttavia, viene sostituita con .BSB.

Il nuovo file di dati diventa il file di dati corrente e l'elettroferogramma con il fondo sottratto viene visualizzato. Il numero di sottrazioni di fondo eseguite viene registrato nella voce Operator dell'intestazione del file di dati.

Se si visualizzano i dati BSB in forma di tabulato, si potrebbero notare delle differenze dovute alla precisione della rappresentazione dei dati.

NOTA

I file della Guida (HELP) relativi a LC/MSD si riferiscono solo ai parametri LC e non ai parametri CE. Alcune funzioni disponibili nel software LC/MSD non sono disponibili o non sono attivate per le applicazioni CE/MSD, ma sono usate in LC. Ad esempio, la funzione di **peak matching** non è applicabile a CE-MS e pertanto non è attiva. In CE-MS, la rivelazione UV e MS avviene a lunghezze effettive differenti del capillare di separazione. Data la risoluzione diversa a lunghezze effettive differenti, la corrispondenza dei picchi non è possibile.

8
Revisione dei dati, rielaborazione e revisione dei lotti

Tavola di navigazione in Analisi dei dati 150
- Configurazione della tavola di navigazione 150
- Barra degli strumenti della tavola di navigazione 152
- Revisione dei dati tramite la tavola di navigazione 153
- Rielaborazione della sequenza tramite la tavola di navigazione 154

Che cos'è la revisione di un lotto? 156

Abilitazione della funzionalità di revisione dei lotti con l'opzione OpenLAB CDS con ECM 157

Configurazione del lotto 158
- Tavola di raggruppamento 158
- Tavola dei composti 159
- Rapporto relativo al lotto 159
- Interfaccia utente 160

Funzioni di revisione 161
- La calibrazione nella revisione di gruppi 161

Rapporto relativo al lotto 162
- Storico lotto 162

Questo capitolo illustra le varie procedure disponibili per revisionare i dati e spiega come rielaborare i dati della sequenza. Inoltre, descrive i concetti di revisione e configurazione dei lotti, le funzioni di revisione e la stesura dei report sui lotti.

Tavola di navigazione in Analisi dei dati

La finestra **Data Analysis** include una tavola di navigazione progettata per facilitare la navigazione nei file di dati. La tavola di navigazione mostra le analisi contenute in una subdirectory selezionata di dati o dati della sequenza. È possibile utilizzare la **Navigation Table** per caricare singole analisi o per scorrere automaticamente i segnali caricati. Per ulteriori informazioni, vedere il manuale *OpenLAB CDS ChemStation Edition, Concetti e flussi di lavoro di base*.

Configurazione della tavola di navigazione

La tavola di navigazione mostra le informazioni sui file di dati in base alle serie di dati disponibili. È di sola lettura e i suoi valori non possono essere sovrascritti.

Tabella 9 Colonne della tavola di navigazione

Colonne analisi singole	Colonne analisi in sequenza
Sovrapposizione	Sovrapposizione
ECM	ECM
TIPO	TIPO
Data / Ora	Riga
Operatore	Iniezione
Vial	Vial
File di dati	Nome del campione
Nome del campione	Nome del metodo
Nome del metodo	Tipo di campione
Eventi manuali	Eventi manuali
Informazioni campione	Livello di calibrazione

Tabella 9 Colonne della tavola di navigazione

Colonne analisi singole	Colonne analisi in sequenza
Quantità di campione	Informazioni campione
Quantità ISTD	Quantità di campione
Moltiplicatore	Quantità ISTD
Diluizione	Moltiplicatore
---	Diluizione
---	File di dati

Include caratteristiche di configurazione standard, come opzioni di ordinamento e trascinamento per spostare le colonne in altre posizioni. Inoltre, è possibile selezionare le colonne in essa visualizzate.

È anche possibile eseguire raggruppamenti specifici per colonna; ad esempio è possibile visualizzare analisi singole di un particolare operatore raggruppando i file caricati in base alla colonna **operator**.

Nella tavola di navigazione è possibile usare il pulsante destro del mouse per caricare un segnale, sovrapporre un segnale, esportare dati, stampare rapporti, visualizzare i parametri del metodo di acquisizione e così via. Ciascuna riga della tavola di navigazione può essere espansa facendo clic sul segno + (più) visualizzato a sinistra per configurare opzioni specifiche per segnale:

- **Signal**: elenca i segnali acquisiti e consente di specificare quelli da caricare. La selezione di visualizzazione del segnale viene applicata singolarmente a ciascuna analisi.
- **General Info**: elenca i dettagli di intestazione dell'analisi.
- **Instrument curves**: consente di selezionare le curve dei dati dello strumento da visualizzare insieme al cromatogramma/elettroferogramma sullo schermo e in stampa.

Barra degli strumenti della tavola di navigazione

La **Navigation Table** include due gruppi di strumenti che consentono di esaminare i dati di analisi singola/sequenza o di rielaborare i dati della sequenza.

Gruppo di strumenti per la revisione di dati

La funzione di revisione della tavola di navigazione consente di esaminare automaticamente o manualmente i segnali caricati. In base alla selezione specificata in **Preferences / Signal/Review**, il sistema può integrare automaticamente il segnale e stampare un report per ciascun file caricato. Il metodo applicato al file di dati è visualizzato nel menu superiore.

Gruppo di strumenti per la rielaborazione della sequenza

Il gruppo di strumenti di rielaborazione della sequenza è disponibile solo quando viene caricata una sequenza acquisita con ChemStation B.02.01 o versioni successive, che sia stata acquisita con la funzione **Unique Folder Creation**. È possibile avviare, interrompere e sospendere la rielaborazione della sequenza. Inoltre, la barra degli strumenti consente di accedere alle seguenti finestre di dialogo per modificare il parametro per la rielaborazione di sequenze e stampa:

- **Sequence Table** (copia del modello *.s originale, presente nel contenitore dei dati della sequenza)
- Finestra di dialogo **Sequence Parameters**
- Finestra di dialogo **Sequence Output**
- Finestra di dialogo **Sequence Summary Parameters**
- Finestra di dialogo **Extended Statistic Parameters**
- **Save Current Sequence**
- **Print Current Sequence**

Revisione dei dati tramite la tavola di navigazione

La revisione dei dati avviene in Modalità di ricalcolo, a cui si accede facendo clic su nella barra degli strumenti della tavola di navigazione. In questo modo viene aperta la serie di strumenti della Modalità di ricalcolo. In base al flusso di lavoro richiesto, è possibile esaminare i dati in tre modi diversi:

1. Esaminare i dati utilizzando il metodo di analisi dei dati contenuto in ogni file di dati (dati della sequenza versione B.02.01 o versioni successive): Selezionare **Start Autosteping** dal menu **Recalculate** in **Data Analysis** per fare in modo che il sistema carichi il singolo metodo di analisi dei dati archiviato con il file di dati prima del caricamento del file di dati. Quando si accede a ciascuna riga nella tavola di navigazione durante il processo di revisione dei dati, il metodo collegato per il file di dati selezionato viene caricato e utilizzato per la revisione e per la generazione del report.
2. Revisione dei dati con un altro metodo. Se per la revisione dei dati si desidera utilizzare un metodo diverso da quello archiviato con il file di dati, selezionare **With method** dal menu **Recalculate** nella modalità **Data Analysis**. In questo caso, si seleziona un metodo e un modello di report dalla finestra di dialogo **Recalculate with Method**. È possibile anche specificare un **Autostep interval** e una **Destination** per il report; i valori selezionati in questa finestra di dialogo ridefiniscono temporaneamente i valori della scheda **Signal/ Review Options** della finestra di dialogo **Preferences** e sono reimpostati quando viene terminata la sessione di ChemStation. Il metodo selezionato viene caricato e utilizzato per calcolare i risultati di tutti i file di dati nell'insieme di risultati.
3. Esaminare i dati usando l'ultimo metodo utilizzato per calcolare i risultati. Selezionare **Start Autostepping** dal menu **Recalculate** nella modalità **Data Analysis**. Questa modalità carica l'ultimo metodo utilizzato per calcolare i risultati del file di dati. Si osservi che, se il file di dati non ha alcun metodo di analisi dei dati corrispondente, viene saltato durante l'autostepping. Questa modalità influisce sia sull'autostepping, sia sul caricamento manuale dei file dei dati.

Rielaborazione della sequenza tramite la tavola di navigazione

NOTA

I dati della sequenza acquisiti con le versioni ChemStation fino alla B.01.03 devono essere rielaborati tramite l'opzione **reprocess** disponibile in **Method and Run Control**. Ciò si applica ai dati acquisiti nella versione B.03.01 con l'opzione **Unique Folder Creation** disattivata.

I dati della sequenza acquisiti con le versioni ChemStation B.02.01 e versioni successive devono essere rielaborati tramite il gruppo di strumenti di rielaborazione disponibile nella tavola di navigazione **Data Analysis**.

Per la rielaborazione tramite la tavola di navigazione disponibile in **Data Analysis**, nel contenitore dei dati della sequenza sono presenti tutti i file necessari:

- File di dati della sequenza (*.d)
- Tutti i file dei metodi (*.m) utilizzati durante la sequenza
- Copia del modello della sequenza originale (*.s)
- File del lotto relativo alla sequenza (*.b)
- Registro elettronico relativo alla sequenza (*.log)

Durante la rielaborazione, vengono aggiornati i singoli metodi DA.M per i file di dati e il file del lotto (*.b).

Le funzioni di rielaborazione disponibili in **Data Analysis** consentono di modificare il modello di sequenza (*.s) nel contenitore dei dati in modo da poter modificare il moltiplicatore, la diluizione, ecc. o utilizzare un metodo diverso per la rielaborazione. Per impostazione predefinita, il parametro della sequenza di rielaborazione disponibile in Analisi dei dati **parts of method to run** è impostata su **Reprocessing only** e l'opzione **Use Sequence Table Information** è selezionata. Questi valori predefiniti consentono di cambiare i parametri nel modello di sequenza e di eseguire una rielaborazione senza modificare di nuovo i parametri della sequenza **Data Analysis**.

Se il metodo nel modello di sequenza non è stato modificato esplicitamente, il sistema utilizza i metodi di sequenza archiviati nel contenitore dei dati della sequenza per rielaborare la sequenza. Questi sono i metodi originali utilizzati durante l'acquisizione dei dati. Se è necessario modificare particolari parametri del metodo (ad esempio specificare la stampa di un file *.xls), occorre modificare e salvare i metodi nel contenitore della sequenza. Questa modifica generale viene quindi applicata a tutti i file di dati durante la rielaborazione.

Se a questo punto si desidera utilizzare il metodo nel contenitore della sequenza aggiornato per l'ulteriore acquisizione dei dati, è necessario copiare questo metodo dal contenitore dei dati della sequenza in uno dei percorsi del metodo definiti. Il metodo nuovo/aggiornato diventa quindi disponibile in ChemStation Explorer, nella finestra dei metodi, come metodo master.

Che cos'è la revisione di un lotto?

La funzione è stata creata per aiutare l'analista ad effettuare una revisione "di massima" dei risultati di una sequenza o di un gruppo di analisi in maniera veloce ed agevole. Ciò consente di risparmiare tempo specialmente quando si deve rielaborare un numero elevato di campioni. Ogni volta che viene eseguita una sequenza, viene creato automaticamente un file di raggruppamento (con estensione a .b) che viene copiato nella directory dei dati insieme a questi ultimi. Il file di raggruppamento contiene puntatori diretti ai file di dati all'interno della funzione di revisione del lotto. Al momento di caricare un gruppo di dati, l'analista deve solo scegliere il metodo da usare e quindi selezionare singolarmente i file di dati desiderati da analizzare. È possibile controllare l'accuratezza della calibrazione, le prestazioni dello strumento e le singole integrazioni prima di approvare i risultati. Qualsiasi parametro di integrazione specifico per un cromatogramma modificato può essere archiviato insieme al file di dati per una maggiore rintracciabilità. Questo tipo di ambiente interattivo consente di accedere a tutte le altre funzioni di elaborazione dei dati, come la purezza dei picchi, la ricerca nella libreria, ecc.

Revisione lotto utilizza gli stessi registri delle funzioni di elaborazione dei dati (ChromReg e ChromRes), quindi non deve essere usata per le sessioni di analisi in corso.

Abilitazione della funzionalità di revisione dei lotti con l'opzione OpenLAB CDS con ECM

Per impostazione predefinita la funzionalità di revisione dei lotti non è disponibile quando si installa OpenLAB CDS con ECM. Per utilizzare la revisione dei lotti, è necessario abilitare questa funzione mediante l'inserimento di un valore nella sezione [PCS] del file ChemStation.ini. Il file si trova nella directory c:\WINDOWS.

```
[PCS] _BatchReview=1
```

Il valore predefinito, _BatchReview=0, disattiva la funzione.

Configurazione del lotto

Si definisce lotto una serie di file di dati scelti dall'utente ed elaborati utilizzando un metodo definito dall'utente. Tutti i file di dati del gruppo vengono processati utilizzando lo stesso metodo. Le fasi del processo effettuate ogni volta che un nuovo campione viene caricato per essere rivisto possono essere preventivamente selezionate (integrazione identificazione/quantificazione, stesura di rapporti).

Tutte le sequenze di calibrazione del gruppo vengono utilizzate per produrre una sola tavola di calibrazione, utilizzando fattori di risposta medi, da usare poi per la quantificazione.

Tavola di raggruppamento

Le analisi eseguite vengono visualizzate in una tavola di raggruppamento configurata dall'utente:

- Può essere specificato il numero ed il contenuto delle colonne della tavola
- Le analisi possono essere suddivise per:
  - Ordine di analisi (l'ordine nel quale sono stati acquisiti i dati) indipendente da altri criteri
  - Tipo di campione (prima i campioni di controllo, poi campioni di calibrazione, quindi i campioni normali) o poi per ordine di analisi per ogni tipo di campione
  - Metodo (se nel corso delle analisi è stato utilizzato più di un metodo) e poi per ordine di analisi relativo a ciascun metodo
- Campioni, campioni di calibrazione e campioni di controllo che possono essere visualizzati all'interno della tavola oppure nascosti.

Ciascuna analisi selezionata occupa una riga della tavola. È possibile escludere un'analisi nella tavola di raggruppamento (ad esempio dalla calibrazione) modificando il tipo di campione in Rimosso.

Tavola dei composti

I risultati relativi ai composti vengono visualizzati sotto forma di tavola configurabile dall'utente ma il contenuto di quest'ultima dipende dal tipo di campioni presenti nella tavola di raggruppamento.

- La lista comprende tutti i composti che si trovano nel metodo caricato per la revisione del gruppo di file.
- Se nella tavola vengono visualizzati solo campioni di calibrazione (i campioni ed i campioni di controllo rimangono nascosti), la tavola dei composti riporterà altre colonne per le informazioni relative alla calibrazione (quantità prevista, errore relativo e assoluto).
- Se nella tavola vengono visualizzate solo analisi di controllo (i campioni ed i campioni di calibrazione rimangono nascosti), la tavola dei composti comprende colonne aggiuntive per qualsiasi limite di controllo definito.

Per le colonne contenenti informazioni specifiche per un singolo composto, è possibile inserire il nome del composto nel titolo della tavola aggiungendo % alla specifica della colonna.

Rapporto relativo al lotto

Il rapporto contiene due tavole generalmente analoghe alla tavola di raggruppamento ed alla tavola di composti; anche queste tavole possono essere configurate dall'utilizzatore.

Per le colonne contenenti informazioni specifiche per un singolo composto, è possibile inserire il nome del composto nel titolo della tavola aggiungendo % alla specifica della colonna. Sono consentiti titoli che occupano più di una riga; si deve inserire il carattere '|' nel punto in cui si desidera andare a capo.

Interfaccia utente

La funzione di revisione consente di scegliere fra due interfacce utente:

- l'interfaccia standard comprende una barra di tasti, che riportano la maggior parte delle voci del menu Batch unitamente alla tavola di raggruppamento ed alla tavola dei composti;
- un'interfaccia ridotta al minimo comprendente una barra di tasti simile a quella dell'interfaccia standard, ma nella quale la tavola di raggruppamento e la tavola dei composti sono sostituite da una casella combinata contenente unicamente le informazioni specificate per la tavola di raggruppamento. La barra di tasti dell'interfaccia minima non contiene pulsanti relativi alla tavola di raggruppamento né alla tavola dei composti.

Funzioni di revisione

I file di dati possono essere visualizzati in due modi:

- Manualmente, selezionando un'analisi da visualizzare dalla tavola.
- Automaticamente con un intervallo predefinito fra ogni file di dati. Durante la visualizzazione automatica, vengono visualizzati solo i campioni riportati nella tavola; le analisi vengono visualizzate nell'ordine in cui vengono visualizzate nella tavola. La revisione automatica può essere interrotta, ripresa o terminata.

Le funzioni standard della ChemStation sono disponibili anche per la revisione di gruppi di file. Esse comprendono la calibrazione e la manipolazione manuale di cromatogrammi, ad esempio la regolarizzazione o l'integrazione manuale. Qualsiasi modifica apportata ad un singolo file di dati può essere contrassegnata e salvata con il file di raggruppamento. I cromatogrammi revisionati sono contrassegnati da un asterisco nella tavola di raggruppamento. Si possono anche eliminare modifiche apportate al cromatogramma corrente oppure a tutti i cromatogrammi del gruppo.

Quando viene caricata un'analisi, le opzioni di elaborazione selezionate verranno eseguite; se un'analisi è stata elaborata e le modifiche salvate, viene caricata immediatamente. Si tratta di un processo molto più veloce rispetto a quello che prevede il caricamento di un'analisi non ancora elaborata perché quest'ultima fase può essere saltata.

La calibrazione nella revisione di gruppi

La calibrazione in questo caso funziona indipendentemente dalle impostazioni di ricalibrazione nella tavola di sequenza. Il primo punto della calibrazione di gruppi sostituisce sempre gli inserimenti relativi a risposta e tempo di ritenzione nella tavola di calibrazione. Per i seguenti standard di calibrazione, viene calcolata una media dei valori di risposta e tempo di ritenzione.

Rapporto relativo al lotto

La “Tavola di raggruppamento” , pagina 158 può essere stampata direttamente su una stampante locale o visualizzata su schermo oppure stampata su file con un prefisso determinato dall'utente in uno dei seguenti formati:

- File di testo UNICODE con estensione .TXT
- File in formato Data Interchange Format con estensione .DIF
- File in formato Comma-Separated Values con estensione .CSV
- File Microsoft Excel con estensione .XLS

Le opzioni di stesura rapporti consentono anche di suddividere i campioni (per indice di analisi, tipo di campione o metodo) indipendentemente dal metodo di suddivisione scelto per la tavola di raggruppamento. Le priorità sono identiche a quelle della “Tavola di raggruppamento” , pagina 158.

Storico lotto

La funzione Batch review (Revisione lotto) tiene traccia di tutte le azioni che si riferiscono al gruppo corrente. Qualsiasi azione di modifica del gruppo di file (ad esempio il cambio di cromatogramma da visualizzare, del tipo di campione, oppure nel caricamento e salvataggio del gruppo) aggiunge una linea allo storico che riporta la data, l'ora ed il nome dell'operatore oltre ad una descrizione dell'evento.

Si possono anche aggiungere commenti individuali. Gli inserimenti già effettuati non possono essere modificati e la lista può essere consultata solo a partire dalla voce Batch History (Storico lotto) contenuta nell'apposito menu.

9 Reporting

Che cos'è ACAML? 164
Schema ACAML 165
Reporting dei fattori della Farmacopea in ChemStation 166

In questo argomento viene spiegato e fornito un riferimento allo schema ACAML utilizzato nella funzionalità Intelligent Reporting del software OpenLAB CDS.

Che cos'è ACAML?

ACAML, *A*gilent *C*ommon *A*nalytical *M*arkup *L*anguage, è un linguaggio di marcatura utilizzato per acquisire e descrivere i dati analitici nel dominio della cromatografia e della spettrometria. ACAML è stato progettato per descrivere tutti i tipi di dati negli ambienti analitici. Con ACAML si intende soprattutto fornire uno standard comune per Agilent, in grado di consentire lo scambio trasparente di informazioni tra le diverse piattaforme e applicazioni.

L'approccio consiste nel definire uno schema di linguaggio indipendente dalla tecnica e dall'applicazione. ACAML può essere utilizzato per descrivere i dati analitici in modo generico, senza alcun aspetto particolare (es. da un punto di vista basato sui risultati): a partire di un unico strumento o metodo, fino a uno scenario complesso con più strumenti, metodi, utenti e centinaia o migliaia di campioni.

Non è richiesta alcuna applicazione aggiuntiva (ad esempio un convalidatore ACAML) per gestire e convalidare le istanze-documenti ACAML. Nella versione iniziale, ACAML supporta solo i dati cromatografici (LC, GC).

Ulteriori informazioni su ACAML sono reperibili nel manuale di progettazione OLIR sul DVD di supporto OpenLAB CDS (disco 6).

Schema ACAML

Base dello schema ACAML è lo standard industriale XML.

Lo schema ACAML è fortemente tipizzato:

- per favorire la standardizzazione nello scambio dei dati e
- per evitare la proliferazione incontrollata di tipi autodefiniti, che rappresenta un ulteriore elaborazione automatizzata molto complicata ovvero impossibile.

La definizione dello schema fa in modo che ogni istanza-documento sia ben definita e venga garantita l'integrità referenziale tra tutti gli oggetti. Per gestire e convalidare istanze-documenti ACAML non sono necessarie applicazioni aggiuntive (come un validatore speciale ACAML).

La definizione dello schema dell'ultima revisione ACAML.1.4.xsd è disponibile sul DVD di supporto a OpenLAB CDS (disco n. 6).

Reporting dei fattori della Farmacopea in ChemStation

Con ChemStation Edition C.01.04 il calcolo dei fattori della Farmacopea è stato completato. I fattori della tavola del picco come definiti in USP, EP e JP sono disponibili per l'uso nei report della ChemStation. La tabella seguente fornisce una panoramica dei fattori disponibili, delle relative definizioni e dei nomi dei valori. Per ulteriori dettagli sui calcoli, vedere le rispettive sezioni di questa guida.

Tabella 10 Valori di Farmacopea nei reporting della ChemStation

USP	EP	JP	Definizione	classic reporting (RLE)	intelligent reporting (RTE)
Fattore di scodamento	Fattore di simmetria	Fattore di simmetria	$S = W_{0,05h}/2f$	Scodamento USP	Peak_TailFactor
-	Ritenzione relativa (corretta)	Fattore di separazione	$r = (t_{R2}-t_0)/(t_{R1}-t_0)$		RelativeRetTime_EP
Ritenzione relativa	-	-	$\alpha = k'_{(a)} / k'_{(b)}$ T_R del picco a < T_R del picco b	Selettività	Peak_Selectivity
-	Risoluzione	Risoluzione	$Rs = 1,18\times(t_{R2}-t_{R1})/(W_{0,5h1}+W_{0,5h2})$	Risoluzione (EP) Risoluzione (JP)	Peak_Resolution_EP Peak_Resolution_JP
-	-	-	$R = \frac{(2.35/2)(T_{R(b)} - T_{R(a)})}{W_{50(b)} + W_{50(a)}}$	Risoluzione	Peak_Resolution_Classic
Risoluzione	-	-	$Rs = 2,0\times(t_{R2}-t_{R1})/(W_1-W_2)$	-	Peak_Resolution_USP
Efficienza			$N = 16\times(t/W)^2$	Metodo Piatti - Tangente	Peak_TheoreticalPlates_USP
-	Efficienza		$N = 5,54\times t_R^2/W_{0,5h}^2$	Metodo Piatti - Metà altezza	Peak_TheoreticalPlates_EP
		Efficienza	$N = 5,55\times t_R^2/W_{0,5h}^2$	-	Peak_TheoreticalPlates_JP

Tabella 10 Valori di Farmacopea nei reporting della ChemStation

USP	EP	JP	Definizione	classic reporting (RLE)	intelligent reporting (RTE)
Tempo di ritenzione relativa	Tempo di ritenzione relativa		$Rr = t_2/t_1$	-	Peak_RelativeRetTime
	Rapporto S/N	Rapporto S/N	$S/N = 2H/h$	-	Peak_SignalToNoise_EP
Rapporto picco-valle	Rapporto picco-valle		$p/v = H_p/H_v$	PeakValleyRatio	Peak_PeakValleyRatio

10
Verifica del sistema

Finestre Verification (Verifica) e Diagnosis (Diagnosi) 170
Verifica del sistema 170
Il registro GLPsave 173
Funzione DAD Test (verifica del rivelatore a serie di diodi) 175
Funzione Revisione test DAD 175

Questo capitolo descrive la funzione di verifica e le funzioni di verifica GLP della ChemStation.

Finestre Verification (Verifica) e Diagnosis (Diagnosi)

Se supportato dagli strumenti configurati, come i moduli Agilent Serie 1100/1200 per LC, la ChemStation comprende due finestre aggiuntive per eseguire le funzioni di verifica e diagnosi. Per ulteriori informazioni, consultare la Guida in linea.

Verifica del sistema

La verifica del sistema è un fattore chiave per l'utilizzo di uno strumento analitico in un laboratorio regolamentato. Le funzioni della ChemStation che permettono di effettuare verifiche secondo la buona prassi di laboratorio (GLP) sono state progettate per aiutare gli utenti a dimostrare che lo strumento, o un suo componente, funziona in modo ottimale o funzionava in modo ottimale al momento in cui è stata effettuata una particolare analisi.

Le funzioni di verifica della ChemStation consentono di controllare che il software funzioni correttamente. È possibile effettuare questa operazione rielaborando i file di dati secondo metodi specifici e paragonando i risultati ad uno standard predefinito. La funzione di verifica è particolarmente importante per provare l'integrità dei risultati di integrazione e quantificazione.

È possibile usare il test di verifica standard o definire test personalizzati usando diversi metodi e file di dati per controllare le combinazioni algoritmiche del software utilizzate dai metodi di analisi. Il test di verifica è un file protetto e non può essere modificato o cancellato.

La funzione Verification (Verifica) della finestra Data Analysis (Analisi dei dati) permette di scegliere fra le seguenti opzioni:

- effettuare un test di verifica del database;
- definire un nuovo test di verifica ed aggiungerlo al database;
- cancellare un test di verifica dal database.

La sezione How To (Come...) della Guida in linea descrive come eseguire queste operazioni. Quando si effettua un test di verifica sulla ChemStation, è possibile scegliere se effettuare il test per intero o selezionare una combinazione di parti.

I risultati del test di verifica vengono salvati nella subdirectory predefinita: c:\CHEM32\1\Verify, unitamente ai file di dati e di metodi. La subdirectory Verify è allo stesso livello delle subdirectory relative a sequenza, metodo e dati. È possibile inviare i risultati ad una stampante o ad un file. I risultati del test, compreso il risultato di un test di verifica combinato, sono positivi o negativi.

Sono disponibili i seguenti test.

Digital Electronics (solo DAD Agilent Serie 1100/1200)

Un cromatogramma di prova viene memorizzato nel rivelatore a serie di diodi. Il cromatogramma viene inviato alla ChemStation dopo essere passato attraverso le stesse fasi di processo dei dati grezzi comuni provenienti da fotodiodi. I dati che ne derivano vengono paragonati ai dati originali archiviati nella ChemStation per questo cromatogramma di prova. Se non c'è corrispondenza il test risulta negativo. Questo test assicura che il sistema elettronico del DAD, che effettua il processo dei dati, funzioni ancora correttamente. Dato che viene utilizzato un cromatogramma di prova memorizzato, la lampada ed il rivelatore a serie di diodi non prendono parte a questo test. Possono comunque essere controllati tramite la “Funzione DAD Test (verifica del rivelatore a serie di diodi)” , pagina 175.

Integrazione del picco

Il file di dati viene di nuovo integrato utilizzando il metodo originale. I risultati vengono paragonati a quelli originali di integrazione archiviati nel registro di verifica. Se non sono corrispondenti il test risulta negativo.

Quantificazione del composto

I composti nei file di dati vengono di nuovo quantificati. I risultati vengono paragonati a quelli originali di quantificazione archiviati nel registro di verifica. Se non sono corrispondenti il test risulta negativo.

Stampa del rapporto

Il rapporto originale viene stampato di nuovo.

La pagina che segue illustra un esempio di test di verifica completato con esito positivo.

```
================================================================
        ChemStation Verification Test Report
================================================================
Tested Configuration:
   Component                       Revision
----------------------------------------------------------------
  ChemStation for LC 3D ChemStation   B.01.01
  Microsoft Windows                       Microsoft Windows XP
  Processor                       Processor_Architecture_Intel
  CoProcessor                     yes

ChemStation Verification Test Details:
  Test Name : C:\CHEM32\1\VERIFY\DEFAULT.VAL
  Data File : C:\CHEM32\1\VERIFY\DEFAULT.VAL\VERIFY.D
  Method    : C:\CHEM32\1\VERIFY\DEFAULT.VAL\VERIFY.M
  Original Datafile             : VERIFY.D
  Original Acquisition Method   : VERIFY.M
  Original Operator             : Hewlett-Packard
  Original Injection Date       : 4/16/93 11:56:07 AM
  Original Sample Name          : Isocratic Std.

Signals Tested:
  Signal  1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=450,80 of VERIFY.D

ChemStation Verification Test Results:

  Test Module            Selected  For Test     Test Result
  ------------------------------------------------------------------
  Digital electronics test   No                    N/A
  Integration test          yes                   Pass
  Quantification test       yes                   Pass
  Print Analytical Report    No                   N/A

ChemStation Verification Test Overall Results:     Pass
```

Il registro GLPsave

Il registro GLPsave viene salvato alla fine di ogni analisi se viene scelto nella lista di controllo del periodo di funzionamento. Esso contiene le seguenti informazioni:

- segnali;
- registro elettronico;
- tavola dei risultati di integrazione;
- tavola dei risultati di quantificazione;
- dati sulle prestazioni dello strumento;
- metodo di analisi dei dati.

Si tratta di un registro completamente protetto, creato dal sistema al momento dell'analisi. È possibile richiamarlo in qualsiasi momento come prova dei metodi analitici.

L'opzione GLPsave Register nella finestra Data Analysis (Analisi dei dati) consente di rivedere il registro in qualunque momento. Il file è protetto da somma di controllo e da codice binario per assicurare che non possa essere modificato.

Se viene utilizzata la finestra di dialogo per scegliere il registro GLPsave, è possibile scegliere le opzioni di revisione dalle seguenti:

- load original method (carica metodo originale);
- load original signals (carica segnali originali);
- load instrument performance data (carica dati sulle prestazioni dello strumento);
- print original method (stampa metodo originale);
- print original integration results (stampa risultati di integrazione originali);
- print original quantification results (stampa risultati quantitativi originali);
- generate original report from the original method and signals (genera rapporto originale da metodo e segnali originali).

Si può usare la funzione di revisione GLP per dimostrare che i dati cromatografici sono originali, provare la qualità delle analisi dai dati sulle prestazioni dello strumento e dimostrare l'autenticità dell'interpretazione dei dati.

Ad esempio è possibile:

- ricaricare e ristampare la parte relativa all'elaborazione dei dati relativi al metodo utilizzato al momento dell'analisi del campione, al fine di provare che la valutazione dei dati, presentata come risultato dell'analisi, non sia stata modificata in alcun modo e
- rivedere i risultati di integrazione e quantificazione per provare l'autenticità del rapporto di stampa.

Funzione DAD Test (verifica del rivelatore a serie di diodi)

Il test del rivelatore può essere usato per la validazione di routine del sistema di uno strumento analitico in un laboratorio regolamentato.

Il test del DAD stabilisce quali sono le prestazioni del rivelatore a serie di diodi. Quando si sceglie DAD Test dal menu Strumento (solo per LC3D e CE) viene eseguito un controllo dello strumento per l'intensità e la calibrazione della lunghezza d'onda. Premendo Salva, i risultati del test vengono automaticamente salvati del database DADTest, in un file chiamato DADTest.Reg che si trova nella directory predefinita dello strumento.

Funzione Revisione test DAD

La funzione **Review DAD Test** del menu Visualizza dell'analisi dei dati consente di rivedere il file DADTest.Reg in qualsiasi momento. Il file è protetto da somma di controllo e da codice binario per verificare che non possa essere modificato.

È possibile scegliere una qualsiasi delle seguenti parti del test:

Show Holmium Spectra Visualizza tutti gli spettri di olmio elencati nella tavola Revisione test DAD. Lo spettro attivo viene segnalato.

Show Intensity Spectra Visualizza tutti gli spettri di intensità elencati nella tavola Revisione test DAD. Lo spettro attivo viene segnalato.

Save as New Database Se viene sostituita la lampada del DAD è possibile reimpostare DADTest cancellando i risultati indesiderati dalla tavola, quindi utilizzando questa funzione per salvare come nuovo database.

Show Selected Spectra Visualizza solo gli spettri selezionati nella tavola.

Show Intensity Graph È possibile tracciare un diagramma di intensità per fornire indicazioni sullo stato della lampada del rivelatore a serie di diodi. Il grafico fornisce una funzione dell'intensità massima rapportata al tempo.

Glossario-IU

A

Apply Manual Events from Method
Applica eventi manuali dal metodo

Area reject
Scarto dell'area

Area Sum
Somma delle aree

Area Sum Slice
Porzione di somma delle aree

Autointegrate
Autointegrazione

Autostep interval
Intervallo autostep

Average
Media

B

baseline point
punto della linea di base

Baseline tracking (no penetration)
Monitoraggio della linea di base (nessuna penetrazione)

C

Calculate Signals Separately
Calcola segnali separatamente

Calculate with Corrected Areas
Calcola con aree corrette

Calibration Settings
Impostazioni calibrazione

capillary isoelectric focusing calibration
calibrazione mediante focalizzazione isoelettrica capillare

CE Mobility
Mobilità CE

Classical Baseline Tracking (no penetrations)
Monitoraggio della linea di base classico (nessuna penetrazione)

D

Data Analysis
Analisi dei dati

Delete Peak(s)
Elimina picchi

Description
Descrizione

Destination
Destinazione

DNA base-pair calibration
calibrazione mediante coppia di basi del DNA

Draw Baseline
Traccia linea di base

E

Effective Mobility Correction
correzione

Extended Performance
Prestazioni estese

Extended Statistic Parameters
Parametri statistiche estesi

F

Floating Average
Media variabile

G

General Info
Informazioni generali

H

Height Reject
Scarto dell'altezza

Height%
Altezza%

I

Ignore
Ignora

Initial Peak Width
Ampiezza iniziale del picco

Instrument curves
Curve strumento

Integration
Integrazione

integration events
eventi di integrazione

Integration Events Table
Tavola degli eventi di integrazione

M

Manual Events
Eventi manuali

Manual Integration
integrazione manuale

Method and Run Control
Controllo metodo ed esecuzione

N

Navigation Table
tavola di navigazione
Negative Peaks
Picchi negativi

O

operator
operatore

P

parts of method to run
Parte del metodo da eseguire
peak width
ampiezza del picco
Peak Width
Ampiezza del picco
peak matching
corrispondenza dei picchi
Performance
Prestazioni
Performance+LibSearch
Prestazioni+LibSearch
Performance+Noise
Prestazioni+rumore
Preferences
Preferenze
Preferences / Signal/Review
Preferenze / Opzioni segnale/revisione
Print Current Sequence
Stampa sequenza attuale
protein molecular weight calibration
calibrazione mediante peso molecolare delle proteine
Protein molecular weight calibration
calibrazione mediante peso molecolare delle proteine

Q

Quantitation Settings
Impostazioni di quantificazione

R

Recalculate with Method
Ricalcola con metodo
Recalibration Settings
Impostazioni di ricalibrazione
Relative Mobility Correction
tipo di correzione
Remove Manual Events from Method
Rimuovi eventi manuali dal metodo
Replace
Sostituzione
reprocess
rielaborazione
Reprocessing only
Solo rielaborazione
Review DAD Test
Revisione test DAD

S

Sample Information
Informazioni campione
Save as New Database
Salva come nuovo database
Save Current Sequence
Salva sequenza attuale
Sequence Output
Output di sequenza
Sequence Parameters
Parametri sequenza
Sequence Summary Parameters
Parametri riepilogo sequenza
Sequence Table
Tavola sequenze
Set Baseline from Range
Imposta linea di base dall'intervallo
Set Low Baseline from Range
Imposta linea di base inferiore dall'intervallo
Shoulder detection
Rilevazione delle spalle
Show Holmium Spectra
Mostra spettri di olmio
Show Intensity Graph
Mostra grafico di intensità
Show Intensity Spectra
Mostra spettri di intensità
Show Selected Spectra
Mostra spettri selezionati
Signal
Segnale
Signal/Review Options
Opzioni segnale/revisione
Slope Sensitivity
Sensibilità della pendenza
Specify Report
Specifica report
Split Peak
Divisione picco
Standard Calibration
Calibrazione standard
Status
Livelli
Subtract Background
Sottrai fondo, BSB

T

Tail Skim Height Ratio
Rapporto altezza-skim coda
Tangent Skim
Tangente di interpolazione

U

Unique Folder Creation
Creazione cartelle esclusive attivata

Update Manual Events of Method
Aggiorna eventi manuali del metodo
Use Sequence Table Information
Usa informazioni della tavola di sequenza
Using Compound
Uso del composto

V

Valley
Valle
Valley Height Ratio
Rapporto altezza-valle

W

With Rsp Factor
Con fattore di risposta

Indice

A

acquisizione dei dati 10
altezza%
  calcolo 88
ampiezza del picco 51
ampiezza iniziale del picco 50
ampiezza picco
  all'altezza x% 119
  tangente 119
apice del picco 22, 31
apice 19
area del picco 47
area%
  calcolo 88
assoluto
  tempo di ritenzione 68
autointegrazione 57

C

calcolo del rapporto segnale-rumore
  senza segnale di riferimento 109
calcolo percentuale 88
calcolo
  ESTD 90
  simmetria del picco 113
calibrazione
  curva 78
  impostazioni 97
CI 128
codifica a colori 14
collocazione linea di base 21, 34
costruzione della linea di base 34
criteri di skim 41
curva di calibrazione
  definizione 78
  descrizione 78
curva
  calibrazione 78

D

derivata 27
determinazione del rumore
  ASTM 107
determinazione rumore ASTM 107
determinazione rumore 104
deviazione standard
  campione 126
  della media 127
  relativa 127
  residuo 79
disallineamento 118
distribuzione t 128

E

ESTD
  calcolo 90
  procedura 90
eventi di integrazione 19, 50
eventi programmati 54
eventi
  integrazione 50

F

fattore di capacità 119
fattore di diluizione 91, 93
fattore di scodamento t 120
fattore di scodamento USP 120
fattore di simmetria
  EP 120
  JP 120
file di dati 10
filtro
  riconoscimento picco 27
fine del picco 23, 30
finestra di riferimento 69
finestra di tempo
  ritenzione/migrazione 68
finestre del tempo di ritenzione 69
formati file
  rapporto raggruppamento 162
formule di idoneità del sistema
  deviazione standard 126
  fattore di capacità 119
  fattore di scodamento, USP 120
  fattore di simmetria 120
  media 126
  numero di piatti 121
  risoluzione 123
  ritenzione relativa 122
  RSD 127
  volume vuoto 116
formule di system suitability
  ampiezza picco 119
formule
  definizione test prestazioni 117
  definizioni generali 116

G

GALP 101
GLP 101
GMP 101

I

inizio picco 22, 30
integrazione manuale 59
integrazione
  eventi iniziali 50
  manuale 59
intervallo di confidenza 128

L

linea di base iniziale 19, 20

M

metodo
  stato 14
moltiplicatore 91, 93
momenti statistici 118
monitoraggio linea di base 36, 37
monitor
  stato strumento 14
multipli
  picchi di riferimento 72

N

norm%
  calcolo 93
  report 93
numero di piatti 121

P

penetrazione linea di base 35
picchi di riferimento
  multipli 72
picchi non assegnati 44
picchi
  prestazioni 99, 117
picco del solvente 48
picco negativo 21
picco
  altezza 88
  finestra del tempo di ritenzione 69
  qualificatori 72
  quantificazione 84
  risposta 73
  simmetria 113
precisione
  formato del numero 131
prestazioni
  definizioni test 117
punti cardinali 22

Q

qualificatori 72
quantificazione
  cos'è? 84
  procedura ESTD 90

R

raggruppamento 28
rapporto di capacità 119
rapporto picco-valle 37
rapporto segnale-rumore
  Farmacopea Europea 110
regolazione dell'integrazione 52
reporting
  valori di Farmacopea 166
residuo
  deviazione standard 79
  relativo 79
riconoscimento picco
  filtro 27
rilevazione delle spalle 51
risoluzione
  USP 123
risposta
  rapporto 73
ritenzione relativa 122

S

scarto dell'altezza 50, 52
scarto dell'area 51
segnale analogico 10
segnale digitale 10
segnale 10
selettività 122
sensibilità della pendenza 50
skim del picco anteriore 43
spalla 32
standard esterno 90
standard
  esterno 90
stato
  strumento 14
strumento
  stato 14
system suitability
  limiti 102
  statistiche incluse 101

T

tangente interpolazione 38
tavola di raggruppamento
  configurazione 158
  formati di output 162
  stesura rapporto 162
  tipo di campione rimosso 158
tempo di fine 19
tempo di inizio 19
tempo di ritenzione
  assoluto 68
  relativa 66, 66

V

valori di Farmacopea 166
volume vuoto 116

www.agilent.com

In questo volume

Questa guida contiene le informazioni di riferimento sui principi operativi, i calcoli e gli algoritmi di analisi dei dati usati in Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition.

Le informazioni contenute qui possono essere utilizzate da professionisti di convalida per la pianificazione e l'esecuzione delle attività di convalida del sistema.

© Agilent Technologies 2010-2012

Printed in Germany
5/2012

M8301-94023

Agilent Technologies